

**SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT LIPOLITIK HASIL ISOLASI
DARI SUSU KACANG TANAH TERFERMENTASI**

SKRIPSI

**Oleh:
SHINTA ENDAH WERDININGSIH
NIM. 15630086**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT LIPOLITIK HASIL ISOLASI
DARI SUSU KACANG TANAH TERFERMENTASI**

SKRIPSI

**Oleh:
SHINTA ENDAH WERDININGSIH
NIM. 15630086**

**Diajukan kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Meperoleh Gelar Sarjan Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

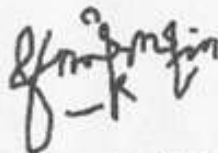
**SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT LIPOLITIK HASIL ISOLASI
DARI SUSU KACANG TANAH TERFERMENTASI**

SKRIPSI

**Oleh:
SHINTA ENDAH WERDININGSIH
NIM. 15630086**

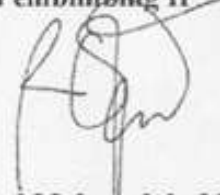
Telah disetujui oleh :

Pembimbing I



**Anik Maunatin, S.T., M.P
NIDT.19760105 20180201 2 248**

Pembimbing II



**Rifatul Mahmudah, M.Si
NIDT.19830125 20160801 2 068**

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**



**Elok Kamillah Hayati, M.Si
NIP. 19790820 200604 2 002**

**SKRINING BAKTERI ASAM LAKTAT LIPOLITIK HASIL ISOLASI
DARI SUSU KACANG TANAH TERFERMENTASI**

SKRIPSI

**Oleh:
SHINTA ENDAH WERDININGSIH
NIM. 15630086**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 15 Juni 2021**

| | | |
|---------------------------|---|---------|
| Penguji Utama | : Eny Yulianti, M.Si | (.....) |
| | NIP. 19760611 200501 2 006 | |
| Ketua Penguji | : Fadilah Nor Laili Lutfia, M. Biotech | (.....) |
| | NIDT. 63033 | |
| Sekretaris Penguji | : Anik Maunatin, S.T., M.P | (.....) |
| | NIDT. 19760611 200501 2 006 | |
| Anggota Penguji | : Rifatul Mahmudah, M.Si | (.....) |
| | NIDT. 19830125 20160801 2 068 | |

**Mengetahui,
Ketua Program Studi**

Elok Kamilah Mayati, M.Si
NIP. 19700620 200604 2 002

PERNYATAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Shinta Endah Werdiningsih
NIM : 15630086
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Skrining Bakteri Asam Laktat Lipolitik Hasil Isolasi Dari
Susu Kacang Tanah Terfermentasi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 25 Juni 2021
Yang Membuat Pernyataan,



Shinta Endah Werdiningsih
NIM. 15630086

MOTTO

“Learn to rest, not to quit”

Doesn't matter if the world is cold place

‘Cause I'm getting cooler

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillahirobbilalamin puji syukur kehadiran Allah Swt atas segala karunia dan rahmat-Nya. Dengan segala kerendahan hati, saya persembahkan skripsi ini kepada kedua orang tua saya Bapak Yanuar dan Ibu Yayuk, serta ketiga adik saya Reveline, Bintang dan Queen. Serta tidak lupa saya ucapkan terimakasih kepada kakak saya Mbak Fitri dan keponakan saya Zahra yang selalu menjadi *moodbooster* saya. Semoga mereka sehat dan selalu dalam lindungan Allah Swt. Aamiin.

Terimakasih kepada diriku sendiri yang tidak menyerah dan tetap melangkah.

Kepada teman-temanku Nisak, Leli, Qumil, Anggra, Kimia C angkatan 15 dan teman-teman yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

All I can say is Thanks, Terimakasih telah mengulurkan tangan dimasa sulit dan dengan senang hati membantu.

Semoga sukses and see you at the top.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Swt yang telah melimpahkan rahmat, ridhoNya serta telah memberikan banyak kesempatan, sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul **“Skrining Bakteri Asam Laktat Lipolitik Hasil Isolasi dari Susu Kacang Tanah Terfermentasi”** tahun akademik 2021. Skripsi ini disusun guna memenuhi kewajiban tugas akhir jenjang S1 Jurusan Kimia UIN Fakultas Sains dan Teknologi Maulana Malik Ibrahim Malang.

Selanjutnya, penulis hanturkan ucapan terimakasih seiring doa dan harapan kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terimakasih ini penulis sampaikan kepada :

1. Orang tua yang telah memberi dukungan materi dan doa sehingga dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Sri Harini M.Si selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Anik Maunatin, S.T., M.P selaku dosen pembimbing, yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, mengarahkan dan memberi masukan dalam kegiatan serta penulisan skripsi.
6. Ibu Rif’atul Mahmudah, M.Si selaku pembimbing agama yang telah banyak membantu dan membimbing.

7. Seluruh dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman dan wawasannya sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
8. Semua mahasiswa Kimia Angkatan 2015 khususnya kelas C Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
9. Kepada semua pihak yang telah membantu secara langsung maupun tidak langsung dan telah memberikan bantuan serta motivasi dalam pengerjaan skripsi, yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa, laporan yang ditulis masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, saran serta kritik yang membangun sangat diharapkan oleh penulis. Semoga penulisan laporan hasil penelitian ini dapat memberikan wawasan dan inspirasi bagi pembaca.

Malang, 25 Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---------------------------|------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSETUJUAN | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iv |
| MOTTO | v |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | vi |
| KATA PENGANTAR | vii |
| DAFTAR ISI | ix |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiii |
| ABSTRAK | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| مخلص البحث | xvi |

BAB I PENDAHULUAN

| | |
|-------------------------------|---|
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3. Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4. Batasan Masalah | 4 |
| 1.5. Manfaat Penelitian | 4 |

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

| | |
|---|----|
| 2.1. Bakteri Asam Laktat | 5 |
| 2.2. Enzim Lipase | 7 |
| 2.2.1 Klasifikasi Lipase | 9 |
| 2.2.2 Lipase dalam Industri | 10 |
| 2.3. Kacang Tanah | 11 |
| 2.4. Media Pertumbuhan dan Seleksi | 13 |
| 2.5. Identifikasi Bakteri Asam Laktat | 15 |
| 2.5.1 Pewarnaan Gram | 15 |
| 2.5.2 Uji Katalase | 16 |
| 2.6. Aktivitas Enzim Lipase | 16 |
| 2.7. Uji <i>Total Plate Count</i> (TPC) | 18 |

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

| | |
|--|----|
| 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian | 19 |
| 3.2. Alat dan Bahan Penelitian | 19 |
| 3.2.1 Alat Penelitian | 19 |
| 3.2.2 Bahan Penelitian | 19 |
| 3.3. Rancangan Penelitian | 20 |
| 3.4. Tahapan Penelitian | 20 |
| 3.5. Pelaksanaan Penelitian | 20 |
| 3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan | 20 |

| | |
|---|----|
| 3.5.2 Pembuatan Media | 21 |
| 3.5.2.1 Media MRSA | 21 |
| 3.5.2.2 Media MRSA-CaCO ₃ | 21 |
| 3.5.2.3 Media MRSB | 21 |
| 3.5.3 Regenerasi Bakteri | 22 |
| 3.5.4 Konfirmasi Bakteri Asam Laktat | 22 |
| 3.5.4.1 Pembentukan Zona Bening pada Media MRSA-CaCO ₃ | 22 |
| 3.5.4.2 Pewarnaan Gram | 22 |
| 3.5.4.3 Uji Katalase | 23 |
| 3.5.5 Skrining Bakteri | 23 |
| 3.5.6 Pembuatan Inokulum | 23 |
| 3.5.7 Produksi Enzim Lipase | 24 |
| 3.5.8 Uji Aktivitas Enzim Lipase | 24 |
| 3.5.9 Pengukuran <i>Total Plate Count</i> (TPC) | 25 |
| 3.5.10 Analisis Data | 26 |

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

| | |
|--|----|
| 4.1. Pembuatan Media MRSA dan MRSB | 26 |
| 4.2. Regenerasi Bakteri | 27 |
| 4.3. Konfirmasi Bakteri Asam Laktat | 28 |
| 4.3.1 Pembentukan Zona Bening pada Media MRSA-CaCO ₃ | 29 |
| 4.3.2 Pewarnaan Gram | 30 |
| 4.3.3 Uji Katalase | 32 |
| 4.4. Skrining Kualitatif Bakteri Asam Laktat Lipolitik | 34 |
| 4.5. Pembuatan Inokulum dan Produksi Lipase | 36 |
| 4.6. Uji Aktivitas Enzim Lipase Secara Kuantitatif | 37 |
| 4.7. Viabilitas Bakteri Asam Laktat | 40 |
| 4.8. Pemanfaatan Susu Kacang Tanah Terfermentasi untuk Produksi Bakteri Asam Laktat Lipolitik dalam Perspektif Islam | 41 |

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

| | |
|-----------------------|----|
| 5.1. Kesimpulan | 45 |
| 5.2. Saran | 45 |

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 4.3.2 Hasil Pewarnaan Gram..... | 30 |
| Tabel 4.3.3 Hasil Uji Katalase | 32 |
| Tabel 4.3.4 Hasil Konfirmasi Bakteri Asam Laktat..... | 33 |
| Tabel 4.4 Hasil Uji Kualitatif Isolat..... | 35 |
| Tabel 4.6 Aktivitas Enzim Lipase pada Masing-masing Isolat..... | 39 |
| Tabel 4.7 Hasil Pengukuran <i>Total Plate Count</i> (TPC) | 40 |
| Tabel L.4.1.1 Aktivitas Enzim Lipase dari Masing-masing Isolat | 59 |
| Tabel L.4.1.2 Rata-rata Aktivitas Enzim Lipase..... | 60 |
| Tabel L.4.2 Jumlah Bakteri Hasil Uji <i>Total Plate Count</i> (TPC)..... | 60 |
| Tabel L.5.1 Absorbansi OD Inokulum Stok | 61 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 2.2 Hidrolisis Trigliserida oleh Enzim Lipase | 10 |
| Gambar 4.1 Media yang Digunakan pada Penelitian | 26 |
| Gambar 4.2 Hasil Regenerasi Isolat | 28 |
| Gambar 4.3.1 Zona Bening pada Media MRSA-CaCO ₃ | 29 |
| Gambar 4.3.2 Hasil Pewarnaan Gram Isolat | 30 |
| Gambar 4.3.3 Hasil Uji Katalase Isolat | 33 |
| Gambar 4.4 Hasil Skrining Isolat Bakteri Asam Laktat Lipolitik | 35 |
| Gambar 4.6.1 Reaksi Hidrolisis Triasilgliserol oleh Lipase | 38 |
| Gambar L.6.1 Hasil Peremajaan Kultur Bakteri | 61 |
| Gambar L.6.2 Inokulum Bakteri Sebelum dan Sesudah Inkubasi | 61 |
| Gambar L.6.3 Hasil Sentrifugasi | 62 |
| Gambar L.6.4 Jumlah Koloni Hidup | 62 |
| Gambar L.6.5 Hasil Akhir Titrasi | 62 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lampiran 1 Rancangan Penelitian | 52 |
| Lampiran 2 Skema Kerja | 52 |
| Lampiran 3 Pembuatan Media dan Reagen | 57 |
| Lampiran 4 Perhitungan | 59 |
| Lampiran 5Tabel | 61 |
| Lampiran 6 Gambar | 61 |

ABSTRAK

Werdiningsih, S.E. 2021. **Skrining Bakteri Asam Laktat Lipolitik Hasil Isolasi dari Susu Kacang Tanah Terfermentasi**. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang. Pembimbing I: Anik Maunatin, S.T., M.P. Pembimbing II: Rif'atul Mahmudah, M.Si.

Lipase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis trigliserol menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Lipase banyak digunakan dalam bidang industri sebagai katalisator yang efisien dan ramah lingkungan. Lipase dapat diperoleh dari berbagai macam sumber, salah satunya dari bakteri asam laktat (BAL). Bakteri asam laktat dapat diisolasi dari berbagai macam olahan susu. Susu kacang tanah merupakan salah satu olahan susu yang belum banyak dikonsumsi di Indonesia. Kacang tanah mengandung lemak yang cukup tinggi yaitu 40-56%. Bakteri asam laktat yang dihasilkan dari isolasi susu kacang tanah terfermentasi diduga memiliki aktivitas lipolitik.

Konfirmasi bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) yang mengandung 0,5% CaCO_3 . Skrining bakteri asam laktat lipolitik dilakukan dengan menggunakan media padat MRS yang mengandung minyak zaitun 1% dan Rhodamine B 1%. Produksi enzim lipase dilakukan dengan waktu inkubasi 18 jam. Ekstrak kasar diperoleh dari filtrat yang dihasilkan pada proses sentrifugasi. Aktivitas enzim lipase diuji dengan metode titrimetri menggunakan minyak zaitun sebagai substrat. Uji aktivitas enzim lipase dilakukan pada suhu 37°C , pH 7 dengan waktu inkubasi 60 menit. Data yang dihasilkan dari penelitian ini dianalisa dengan menggunakan metode deskriptif.

Hasil penelitian ini diperoleh lima isolat bakteri asam laktat lipolitik yaitu isolat B, C, D, K dan L. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya zona bening yang terbentuk pada media MRSA- CaCO_3 . Aktivitas enzim terbesar dihasilkan oleh isolat B dengan nilai aktivitas enzim lipase 4,05 U/mL dan aktivitas lipase terendah dimiliki oleh isolat K dengan nilai 3,663 U/mL.

Kata Kunci: Susu Kacang Tanah Terfermentasi, Bakteri Asam Laktat, Lipase, Minyak Zaitun, *Rhodamine B*.

ABSTRACT

Werdiningsih, S.E. 2021. **Screening of Lipolytic Lactic Acid Bacteria from Peanut Fermented Milk**. Thesis. Departement of Chemistry. Faculty of Science and Technology State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: Anik Maunatin, S.T., M.P. Supervisor II: Rif'atul Mahmudah, M.Si.

Lipase is an enzyme that hydrolize triglycerol to glycerol and free fatty acids. Lipase were frequently used in industrial as an efficient and eco-friendly catalyst. Lipase were isolated from many source such as lactic acid bacteria (LAB). The source of lactic acid bacteria are generally found in milks. Peanut milk is one kind of milk that maybe produce lactic acid bacteria. Peanut contain 40-56% fat, which is high enough of fat. Lactic acid bacteria isolated from fermented peanut milk are suspected had an lipolytic activity.

Lactic acid bacteria were confirmed by *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) added by 0,5% CaCO_3 . Screening of lipolytic lactic acid bacteria using selective medium containing of olive oil 1% and Rhodamin B 1%. Lipase enzyme were produced by incubation at 18 hours. Crude extract were obtained from the centrifugation process. The activity of lipase was evaluated by titrimetic method using olive oil as substrate. Activity of lipase were incubated at 37°C for 60 minutes. Analyze of the data using descriptive method.

Five isolate of fermented peanut milk designated as code B, C, D, K and L were confirmed as lipolytic lactic acid. Isolate B showed the highest of lipase activity 4,05 U/mL and the lowest activity of lipase were showed by isolate K 3,663 U/mL.

Keyword: Fermented Peanut Milk, Lactic Acid Bacteria, Lipase, Olive oil, Rhodamine B.

مستخلص البحث

وردنينجسيه، سنتا. إ. ٢٠٢١. فحص بكتيريا حمض اللاكتيك الدهني المعزول من حليب الفول السوداني المخمر. رسالة الجامعي. قسم الكيمياء. كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: عنيق مونة، الماجستير. المشرف الثاني: رفعة المحموده، الماجستير.

الليباز هو إنزيم يستخدم على نطاق واسع في القطاع الصناعي لتحليل ثلاثي الجلسرين إلى الجلسرين. إنزيم الليباز المستخدم في الصناعة عموما تأتي من الكائنات الحية الدقيقة مثل الفطريات والبكتيريا. بكتيريا حمض اللاكتيك هي بكتيريا معروفة بإنتاج إنزيم الليباز. يعتقد أن بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من حليب الفول السوداني المخمر لها نشاط إنزيمي محلل للدهون. الهدف من هذا البحث لمعرفة نشاط إنزيم الليباز في عزل بكتيريا حمض اللاكتيك في حليب الفول السوداني المخمر.

تم إجراء الاختيار النوعي لبكتيريا حمض اللاكتيك المحللة للدهون باستخدام وسائط التي تحتوي على زيت الزيتون ورودامين ب. وتم إنتاج إنزيم الليباز عن طريق أخذ راسب الطرد المركزي من اللقاح الذي تم تحضينه لمدة ساعة. نشاط إنزيم الليباز يختبر بطريقة المعايرة باستخدام ومؤشر. أما تحليل البيانات المستخدم في هذا البحث هو الطرق الوصفية.

دلتا النتائج أن خمس عزلات بكتيرية كانت عبارة عن بكتيريا حمض اللاكتيك المحللة للدهون وهي العزلات ب و ج و د و ك و ل. بناء على الاختبار باستخدام صبغة جرام، يشتبه في أن العزلة البكتيرية من جنس. وتم إنتاج أعلى نشاط إنزيم الليباز بواسطة العزلات ب و ج بقيم نشاط 0.40 U/mL , 3.366 U/mL على التوالي عند 400 درجة مئوية مع درجة حموضة 7 ومدة حضانة 60 دقيقة.

الكلمات المفتاحية: حليب الفول السوداني المخمر، بكتيريا حمض اللاكتيك، الليباز، زيت الزيتون، رودامين ب

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim merupakan salah satu alternatif yang banyak digunakan sebagai biokatalisator untuk mempercepat reaksi dalam proses industri. Aplikasi enzim sangat luas baik dalam skala laboratorium ataupun komersial. Enzim dinilai ramah lingkungan dan dapat meningkatkan mutu bahan. Salah satu enzim yang berperan penting dalam proses industri adalah enzim lipase. Enzim lipase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas (Helen *et al.*, 2010). Aplikasi enzim lipase dalam bidang industri sangat luas diantaranya pada industri detergen, makanan, tekstil, minyak, pelumas, kosmetik dan masih banyak lagi (Yan *et al.*, 2017; Sarmah *et al.*, 2018).

Enzim lipase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Sebagian besar lipase komersial dihasilkan oleh mikroorganisme seperti ragi, jamur dan bakteri (Singh *et al.*, 2019). Lipase yang dihasilkan oleh mikroorganisme telah berhasil diisolasi dari berbagai sumber seperti limbah pabrik minyak (Mobarak-Qamsari *et al.*, 2011), sumber air panas (Norashirene *et al.*, 2013), whey susu (Knob *et al.*, 2020) dan masih banyak lagi. Lipase yang dihasilkan oleh mikroorganisme menunjukkan aktivitas optimal pada pH netral mendekati basa (Demera *et al.*, 2019). Lipase yang dihasilkan oleh bakteri lebih disukai dalam bidang industri (Telussa *et al.*, 2013).

Bakteri merupakan tanda kebesaran Allah Swt bagi manusia yang selalu berpikir, seperti yang tersirat pada Quran surat As Shad ayat 27 yang berbunyi:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا
مِنَ النَّارِ

“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada di antara keduanya dengan batil (tanpa hikmah). Yang demikian adalah anggapan orang-orang tak beriman (kafir) karena itu mereka akan masuk neraka” (Q.S As Shad : 27)

Ayat tersebut menyatakan bahwa Allah Swt menciptakan segala sesuatu yang ada di langit, bumi dan diantaranya bukanlah tanpa tujuan melainkan memudahkan kehidupan manusia. Langit dan segala yang menghiasinya, matahari yang menyinari siang serta bulan yang menerangi malam telah Allah ciptakan secara teratur dan rapi. Semua yang terdapat baik di permukaan maupun yang terkandung dalam perut bumi merupakan campur tangan Allah Swt. Begitupun bakteri, bakteri merupakan salah satu makhluk yang bahkan tidak nampak oleh mata manusia namun, memiliki manfaat yang besar bagi kehidupan manusia.

Salah satu bakteri yang diketahui dapat menghasilkan enzim lipase adalah bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat merupakan bakteri yang mampu mengubah karbohidrat menjadi senyawa asam. Bakteri asam laktat yang mampu menghasilkan enzim lipase disebut dengan bakteri asam laktat lipolitik. Sebagian besar bakteri asam laktat berperan dalam proses fermentasi makanan. Bakteri asam laktat dapat ditemukan dalam fermentasi berbagai jenis daging, buah-buahan (mangga, nangka, kedondong dan sirsak), sayuran (asinan sawi, rebung, timun, terong dan bawang) serta fermentasi susu (Esteban, 2015).

Bakteri asam laktat disebut juga disebut sebagai bakteri susu karena banyak ditemukan pada berbagai jenis susu. Manvar (2019), juga berhasil mengisolasi bakteri asam laktat penghasil lipase (lipolitik) yang berasal dari susu

sapi. Selain susu sapi, susu dan keju yang dihasilkan oleh domba juga dapat menghasilkan bakteri asam laktat (Katz, 2002). Aktivitas bakteri asam laktat lipolitik yang berasal dari domba sebagian besar dihasilkan oleh susu domba mentah (Silva, 2020). Selain susu sapi dan domba, bakteri asam laktat lipolitik juga berhasil diisolasi dari saluran pencernaan kepiting bakau (*Scylla sp.*) (Suciati, 2016).

Bakteri asam laktat lipolitik sudah banyak diteliti dari susu hewani, hanya sedikit penelitian yang berasal dari susu nabati. Susu kacang tanah dinilai berpotensi dalam menghasilkan bakteri asam laktat penghasil lipase karena, kandungan lemak yang cukup tinggi yaitu 40-56%. Tingginya kandungan lemak dalam kacang tanah dapat menjadi indikasi adanya enzim lipase. Ketersediaan kacang tanah yang murah dan melimpah dapat menjadi solusi sebagai sumber penghasil enzim lipase yang ekonomis. Oleh sebab itu, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui hasil skrining bakteri asam laktat lipolitik dari susu kacang tanah terfermentasi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang yang telah disampaikan, rumusan masalah pada penelitian ini adalah bagaimana hasil skrining bakteri asam laktat lipolitik dari susu kacang tanah terfermentasi?

1.3. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil skrining bakteri asam laktat lipolitik dari susu kacang tanah terfermentasi.

1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

1. Isolat bakteri yang digunakan merupakan hasil isolasi dari susu kacang tanah dengan kode isolat B, C, D, K dan L.
2. Konfirmasi bakteri asam laktat meliputi pembentukan zona bening pada media selektif MRSA-CaCO₃, pewarnaan Gram dan uji Katalase.
3. Media skrining bakteri asam laktat lipolitik yang digunakan adalah media padat MRS yang ditambahkan dengan minyak Zaitun dan Rhodamine B.

1.5. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai isolat bakteri asam laktat dengan potensi lipolitik dari susu kacang tanah terfermentasi.

BAB II

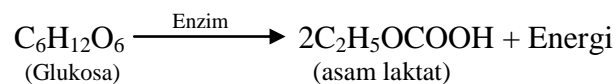
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat atau yang biasa disebut BAL merupakan golongan bakteri yang dapat menguraikan karbohidrat menjadi senyawa asam. Perubahan senyawa karbohidrat menjadi asam dapat menurunkan nilai pH sehingga, menimbulkan rasa asam (Muchtadi., 2010; Salminen *et al.*, 2012). Bakteri asam laktat tidak bersifat patogen dan aman ketika dikonsumsi oleh manusia. Bakteri asam laktat telah diketahui dapat menghasilkan berbagai macam antimikrobia seperti bakteriosin, antijamur, asam organik dan peroksida. Produk olahan dari asam laktat berpotensi sebagai probiotik yang dapat menambah sistem kekebalan tubuh manusia (Mutia, 2013). Bakteri asam laktat tergolong dalam bakteri Gram positif dengan hasil uji katalase negatif dan dapat tumbuh dalam kondisi tanpa oksigen atau anaerobik (Hardiningsih dkk., 2006; Bruno, 2011).

Berdasarkan produk akhir yang dihasilkan dari proses metabolismenya, BAL dapat dibagi menjadi dua golongan yaitu golongan *heterofermentatif* dan golongan *homofermentatif*. Bakteri asam laktat *heterofermentatif* menghasilkan CO₂, etanol dan asam organik berupa asam laktat, asam asetat, asam format, sebagai produk akhir metabolisme. Spesies bakteri yang tergolong dalam bakteri asam laktat *heterofermentatif* adalah *Leuconostoc* dan beberapa *Lactobacillus*. Asam laktat dihasilkan oleh golongan bakteri asam laktat *heterofermentatif*. Beberapa spesies bakteri asam laktat *homofermentatif* yaitu *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* dan beberapa *Lactobacillus* (Rizcikal., 2017).

Salah satu penggunaan asam laktat adalah sebagai biopreservatif alami dalam proses fermentasi makanan ataupun minuman. Komponen kompleks dalam bahan makanan akan diubah menjadi komponen yang lebih sederhana oleh bakteri asam laktat ketika proses fermentasi. Bakteri asam laktat memiliki kemampuan dalam menghasilkan pengasaman melalui sintesis asam organik. Reaksi glukosa menjadi asam laktat adalah sebagai berikut:



Asam laktat atau asam 2-hidroksipropanoat ($\text{CH}_3\text{CHOH-COOH}$) dikenal sebagai asam susu. Bakteri asam laktat banyak ditemukan dari berbagai jenis produk susu seperti pada susu domba, yak, kuda betina, sapi, kambing dan susu unta mentah (Yu *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2012). Pemanfaatan bakteri asam laktat pada makanan diantaranya sebagai starter pada tahu, kecap, youghurt, mentega, tempe dan keju. Produk asam laktat banyak ditemukan dalam probiotik sebagai suplemen kekebalan tubuh (Mutia., 2013).

Bakteri asam laktat telah berhasil diisolasi dari berbagai macam sumber alami seperti bunga, sayur dan buah-buahan. Bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari buah salah satunya berasal dari jus buah cherimoya (Isas., 2020). Pengasaman menggunakan bakteri asam laktat dapat mencegah bahan makanan terkontaminasi oleh mikroorganisme berbahaya. Penggunaan asam laktat juga dapat memperpanjang umur penyimpanan dari bahan makanan (Isas *et al.*, 2020) dan meningkatkan nutrisi dari bahan makanan (De Cagno., 2013; Filaninno *et al.*, 2020).

Bakteri asam laktat diketahui dapat menghasilkan berbagai macam aktivitas enzimatis seperti misalnya proteolitik, esterolitik, amilolitik, dan lipolitik

(Katz *et al.*, 2002; Suciati., 2016). Bakteri asam laktat lipolitik merupakan salah satu jenis bakteri asam laktat yang mampu menguraikan lemak. Beberapa spesies bakteri asam laktat lipolitik telah berhasil diisolasi dari berbagai macam sumber diantaranya pada saluran pencernaan kepiting bakau (*Scylla spp.*) yaitu *Pediococcus sp*, *Streptococcus sp* dan *Lactobacillus sp* (Suciati., 2016). *Lactobacillus lactis* berhasil diisolasi dari bekasam ikan Bandeng (Umaiya., 2015). Bakteri asam laktat lipolitik spesies *Lactobacillus plantarum* juga telah berhasil diisolasi dari berbagai macam sayur yang telah difermentasi (Esteban., 2015).

2.2. Enzim Lipase

Enzim banyak digunakan sebagai biokatalisator dalam bidang industri. Sebagai biokatalis, enzim digunakan untuk mempercepat reaksi katalitik sehingga efisien dalam menghasilkan produk. Enzim banyak digunakan karena ramah lingkungan dan dapat meningkatkan kualitas dari bahan baku. Keberadaan enzim merupakan salah satu bukti kebesaran Allah Swt bagi manusia yang selalu berfikir. Sebagaimana yang tersirat dalam Qur'an surat Al- Baqarah ayat 29 yang berbunyi:

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ ۚ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ

“Dialah (Allah) yang menciptakan segala yang ada di bumi untuk kamu kemudian Dia menuju ke langit, lalu Dia menyempurnakannya menjadi tujuh langit. Dan Dia Maha mengetahui segala sesuatu”(Q.S Al Baqarah:29)

Ayat tersebut menjelaskan apabila Allah Swt telah menciptakan alam semesta dengan sangat kompleks sehingga manusia dapat memanfaatkan isinya

dengan bijak. Menurut tafsir Quraish Shibab, Allah telah memberikan karunia dengan menciptakan semua yang terdapat di bumi dan langit untuk memenuhi kebutuhan manusia. Penciptaan tersebut terdapat apa yang nampak ataupun tidak oleh mata manusia. Enzim merupakan salah satu makhluk ciptaan Allah dengan segala kelebihanannya. Allah telah berfirman dalam surat An Nahl ayat 8:

وَالْحَيْلَ وَالْبِغَالَ وَالْحَمِيرَ لِتَرْكَبُوهَا وَزِينَةً وَيَخْلُقُ مَا لَا تَعْلَمُونَ

“Dan (Dia telah menciptakan) kuda, bagal, dan keledai, untuk kamu tunggangi dan (menjadi) perhiasan. Dan Allah menciptakan apa yang tidak kamu ketahui (Q.S An Nahl: 8).

Lafadz ‘وَيَخْلُقُ مَا لَا تَعْلَمُونَ’ (Dan Allah menciptakan apa yang tidak kamu ketahui) yang berarti Allah menciptakan makhluk-mahluk yang tidak kita ketahui selain yang telah disebutkan yang berada di darat, laut dan yang belum pernah dilihat ataupun didengar oleh manusia. Meskipun begitu, Allah telah menciptakan segala sesuatu di muka bumi bermanfaat bagi kehidupan manusia. Penemuan apapun yang telah ditemukan oleh manusia telah disinggung di dalam Al Quran. Bakteri merupakan salah satu contoh dari makhluk yang tidak dapat kita lihat wujudnya secara langsung, tetapi ada dan telah diketahui memberikan banyak manfaat dalam kehidupan manusia.

Enzim lipase atau *triacylglycerol acylhydrolase* (EC 3.1.1.3) merupakan kelompok enzim dari kelas hidrolase. Lipase mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan ester pada rantai panjang asam lemak (trigliserida) menjadi gliserol dan asam lemak bebas (Helen *et al.*, 2010). Perbedaan kepolaran antara enzim dan substrat menyebabkan reaksi terjadi pada antar muka fasa air dan fasa minyak. Lipase melindungi sisi aktif, sehingga interaksi dengan permukaan hidrofobik seperti

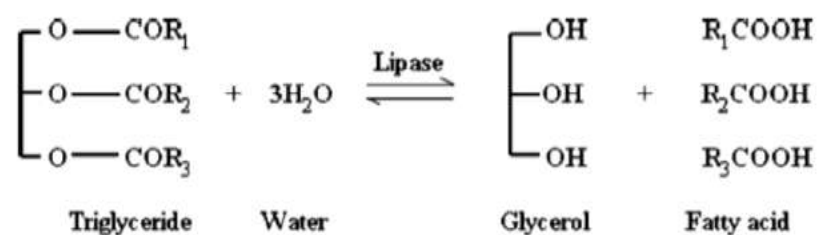
droplet lemak, pergerakan memungkinkan adanya jalan untuk membuka sisi aktif pada substrat.

Lipase dapat ditemukan dari berbagai macam sumber seperti hewan tumbuhan dan mikroba. Lipase yang berasal dari hewan ditemukan dalam tiga bagian yaitu pada sistem pencernaan, pada jaringan dan dalam susu. Lipase yang berasal dari tumbuhan dikelompokkan menjadi 4 jenis yaitu *Triasilgliserol* lipase (minyak sawit, kacang, beras dan kentang), *Silhidrolase* (kentang), *Phospolipase* (seledri, kol dan kacang) dan *Liphospolipase* (jagung). Lipase yang dari mikroba berasal dari bakteri, kapang dan khamir (Yusnizar, 2001).

2.2.1 Klasifikasi Lipase

Lipase yang dihasilkan oleh bakteri diproduksi secara ekstraseluler. Lipase yang dihasilkan oleh bakteri banyak digunakan dalam bioteknologi dan kimia organik. Rentang pH dan temperatur enzim lipase sangat luas, beberapa lipase yang dihasilkan oleh bakteri aktif pada pH netral cenderung basa. Lipase memiliki 3 asam amino yaitu aspartat, histidin dan serin. Enzim lipase merupakan golongan serin hidrolase dengan stabilitas yang tinggi pada pelarut organik.

Sisi aktif enzim lipase terdapat pada gugus hidroksil (-OH) dalam serin. Beberapa lipase menunjukkan aktivitas *chemo-*, *regio-* dan *enantioselectivity*. Enzim lipase akan mengkatalisis suatu reaksi apabila terjadi *lipid-water interface* yaitu suatu mekanisme yang mana sisi aktif lipase akan terbuka ketika berinteraksi dengan substrat yang memiliki kelarutan rendah terhadap air (Zheng *et al.*, 2010). Proses hidrolisis lipase dapat dilihat pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Hidrolisis Trigliserida oleh enzim lipase

Proses hidrolisis enzim lipase pada mikroba terjadi pada gugus ester yang terletak pada posisi primer. Reaksi yang dilakukan oleh enzim lipase dapat berbalik ke arah esterifikasi sehingga dapat membentuk gliserida. Lipase bekerja pada ikatan ester karboksil yang terletak pada triasilgliserol untuk memisahkan asam lemak dan gliserol. Substrat alami untuk lipase adalah triasilgliserol rantai panjang yang memiliki kelarutan yang rendah di dalam air. Reaksi tersebut dikatalisis pada daerah yang menghubungkan antara lipid dan air.

2.2.2 Lipase dalam Industri

Pemanfaatan lipase dalam bidang industri adalah sebagai katalisator pendegradasi lemak. Lipase banyak digunakan karena murah dan serbaguna untuk mendegradasi lipid. Aplikasi lipase dalam bidang industri sangat luas, baik dalam bidang pangan ataupun non pangan. Industri pangan memanfaatkan lipase sebagai biopreservatif dan starter fermentasi (Esteban, 2013). Penggunaan lipase dalam bidang pangan diantaranya sebagai *flavouring agents* untuk produk susu, meningkatkan aroma serta memperpanjang umur simpan pada industri kue dan roti, meningkatkan aroma dan mempercepat fermentasi pada produk alkohol seperti sake dan bir, meningkatkan kualitas dan tekstur pada bumbu, dan dapat meningkatkan aroma serta mengubah lemak pada produk ikan dan daging (Flores & Toldra, 2011).

Selain dalam bidang pangan lipase juga sering digunakan dalam bidang non pangan diantaranya industri pengolahan limbah, industri deterjen, biodiesel, kosmetik (Yan *et al.*, 2017). Lipase dalam industri detergen digunakan untuk mengubah noda minyak dan menguraikannya sehingga dapat lebih mudah terlepas dari baju. Industri farmasi memanfaatkan lipase sebagai bahan obat untuk mempermudah daya cerna (*digestas*). Industri kosmetik juga digunakan dalam bidang kosmetik sebagai bahan untuk sabun kulit. Enzim lipase juga dapat digunakan sebagai sumber energi alternatif untuk mengubah minyak nabati menjadi bahan bakar atau yang biasa disebut dengan biodiesel. Bahan bakar yang dihasilkan oleh enzim lipase memiliki keuntungan yaitu lebih ramah lingkungan (Sarmah *et al.*, 2017).

2.3. Kacang Tanah

يُنْبِتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ

“Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya padayang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang salah”(Q.S An Nahl: 11).

Tafsir Ibnu Katsir menjelaskan bahwa, Allah telah memberikan nikmat dan berkahNya kepada manusia melalui air hujan yang turun dari langit. Allah Swt menjadikan air hujan tawar dan tidak menjadikannya asin atau pahit sehingga manusia dapat menjadikannya sebagai sumber air minum. Tafsir Fi Zhilail-Quran menuliskan apabila tidak hanya sebagai minuman, air hujan juga bermanfaat dalam menyuburkan sawah dan ladang (Abdulah, 2003). Tanda-tanda kebesaran Allah Swt juga telah tersirat dalam surat Ali Imran ayat 27:

تُولِجُ اللَّيْلَ فِي النَّهَارِ وَتُولِجُ النَّهَارَ فِي اللَّيْلِ وَتُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَتُخْرِجُ الْمَيِّتَ مِنَ الْحَيِّ

وَتَرْزُقُ مَنْ تَشَاءُ بِغَيْرِ حِسَابٍ

"Engkau masukkan malam ke dalam siang dan Engkau masukkan siang ke dalam malam. Dan Engkau keluarkan yang hidup dari yang mati, dan Engkau keluarkan yang mati dari yang hidup. Dan Engkau berikan rezeki kepada siapa yang Engkau kehendaki tanpa perhitungan" (Q.S Ali Imran: 27).

Berdasarkan ayat Al Qur'an tersebut, Allah telah menurunkan hujan untuk menyuburkan biji-bijian di bumi agar manusia dapat memanfaatkan dengan bijak. Menurut Syaikh Muhammad bin Shalih, ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah memiliki kekuasaan penuh dalam mengendalikan bumi. Allah menyempurnakan yang kurang sehingga tegaklah kemaslahatan bagi seluruh makhlukNya. Kuasa Allah mampu mengeluarkan yang hidup dari yang mati ataupun sebaliknya. Seperti Allah dapat menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang hidup dari biji-bijian yang mati. Sehingga, biji-bijian tersebut yang nantinya dapat menjadi sumber makanan bagi manusia.

Sebagai bentuk pengkajian ayat-ayat Allah, maka dilakukan penelitian pada kacang tanah sebagai sarana untuk eksplorasi kacang tanah dan juga bentuk usaha pemanfaatan sumberdaya tanpa harus merusak lingkungan. Kacang tanah merupakan salah satu jenis biji-bijian yang banyak digunakan oleh masyarakat Indonesia. Kacang tanah (*Arachis hypogea L*) termasuk dalam jenis polong-polongan atau legume dalam famili fabaceae. Kacang tanah merupakan jenis tumbuhan tropika yang dapat tumbuh di daerah tropis. Kacang tanah memiliki panjang batang antara 30 sampai 50 cm dengan daun yang kecil (Mutia, 2013).

Kacang tanah merupakan sumber protein nabati dengan banyak kandungan senyawa. Biji kacang tanah mengandung protein sebesar 27% dan

lemak sebesar 50% sisanya berupa karbohidrat dan vitamin. Biji kacang tanah dapat dikonsumsi mentah, digoreng atau disangrai. Konsumsi kacang tanah dapat mencegah penyakit jantung. Satu ons kacang tanah mengandung 18 gram Omega 3 dan 17 gram Omega 9. Omega 3 yang merupakan lemak tak jenuh ganda dan Omega 9 yang merupakan lemak tak jenuh tunggal. Kandungan senyawa tersebut juga baik dalam mencegah kolesterol dalam tubuh (Rasyid., 1974).

Kacang tanah telah dibudidayakan secara luas di seluruh daerah Indonesia. Produksi kacang tanah di Indonesia menempati posisi kedua setelah kacang kedelai. Masyarakat Indonesia menggunakan kacang tanah sebagai bahan pangan dan bahan industri. Selain sebagai bahan pangan bagi manusia, kacang tanah juga banyak digunakan sebagai bahan pakan ternak. Kandungan lemak yang tinggi pada kacang tanah dapat menjadi indikasi adanya enzim lipase yang tinggi.

2.4. Media Pertumbuhan dan Seleksi

Media adalah zat yang mengandung nutrisi yang berfungsi sebagai tempat pertumbuhan dan memperbanyak jumlah mikroba. Bakteri dapat tumbuh dan berkembang biak pada media dengan kandungan nutrisi yang baik dan lengkap (Balya dkk., 2011). Berbagai macam media dapat digunakan untuk menumbuhkan bakteri. Pemilihan media tergantung pada komposisi dan jenis bakteri yang akan ditumbuhkan. Setiap bakteri membutuhkan nutrisi dan kandungan media yang berbeda agar dapat tumbuh dan berkembang biak. Media standar untuk menumbuhkan bakteri asam laktat adalah media *de Man Rogosa Sharpe* atau dapat disingkat menjadi MRS.

Media MRS terdiri dari dua jenis yaitu media MRS padat (MRSA) dan media MRS cair (MRSB). Media MRS padat digunakan untuk menumbuhkan, memperkaya dan memperbanyak jumlah koloni bakteri. Media MRS cair digunakan pada proses pembuatan inokulum bakteri dan produksi sel bakteri. Kedua media baik MRSA dan MRSB mengandung *meat extract*, *yeast extract*, *potassium*, *Tween 80*, polisorbate, kasein, asetat, magnesium dan mangan sebagai faktor penumbuh bagi bakteri asam laktat (Rustan, 2013).

Media padat yang biasa digunakan untuk menumbuhkan bakteri asam laktat adalah media MRSA yang telah ditambahkan dengan CaCO_3 0,5%. Kalsium karbonat atau CaCO_3 merupakan senyawa basa yang memiliki kemampuan untuk menetralkan asam. Asam yang diproduksi oleh bakteri asam laktat nantinya akan dinetralkan oleh CaCO_3 pada media. Penetralkan asam laktat oleh kalsium karbonat akan membentuk zona bening yang muncul di sekitaran koloni bakteri. Zona bening menandakan apabila bakteri tersebut merupakan golongan bakteri asam laktat (Dian., 2013).

Bakteri asam laktat lipolitik dapat diseleksi dengan menggunakan media MRSA yang telah ditambahkan dengan minyak zaitun dan Rhodamin B. Minyak zaitun digunakan sebagai substrat yang nantinya akan dihidrolisis oleh enzim lipase. Minyak zaitun dipilih karena mudah untuk didapat serta memiliki harga yang ekonomis. Rhodamin B merupakan senyawa flourosense yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi enzim lipase dalam suatu sampel. Rhodamin B nantinya akan bereaksi dengan asam lemak yang berhasil diuraikan oleh sampel sehingga, membentuk zona yang dapat berpendar ketika diamati di bawah sinar UV (Telussa., 2013).

Media cair untuk memproduksi enzim adalah media *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRSB). Media MRSB memiliki kandungan senyawa yang sama dengan media *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) kecuali bacto agar. Minyak zaitun ditambahkan sebagai sumber karbon dan substrat bagi lipase. Bakteri yang semula sedikit akan membelah diri dan berkembang menjadi banyak. Peningkatan jumlah sel bakteri ditandai dengan berubahnya warna media menjadi lebih pekat.

2.5. Identifikasi Bakteri Asam Laktat

2.5.1 Pewarnaan Gram

Bakteri yang terdapat di alam sangat beragam dan memiliki ciri yang hampir serupa. Bakteri pada umumnya tidak memiliki warna ketika berada di dalam air sehingga dibutuhkan identifikasi lanjutan untuk mengetahui jenis dan golongan bakteri. Identifikasi golongan bakteri dapat dilakukan dengan metode pewarnaan. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengelompokkan bakteri ke dalam dua jenis yaitu Gram positif dan Gram negatif. Pengelompokan Gram bakteri dilakukan berdasarkan struktur dinding sel yang dimiliki oleh bakteri. Hasil pewarnaan sel bakteri juga dapat digunakan untuk mengetahui bentuk sel dari bakteri.

Prinsip dasar dari pewarnaan Gram adalah adanya ikatan antara komponen seluler dari bakteri dengan senyawa aktif dari pewarna (kromogen). Ikatan terjadi karena adanya muatan listrik pada senyawa seluler bakteri dan pada zat kromogen dari pewarna (Umsl., 2008). Reagen yang digunakan adalah kristal violet, iodin, alkohol dan reagen safranin. Bakteri Gram positif akan menunjukkan warna ungu ketika dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop.

Sedangkan bakteri Gram negatif menghasilkan warna pink/merah yang dihasilkan oleh reagen safranin (Benson., 2001).

2.5.2 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut memiliki enzim katalase yang dapat mereduksi efek toksik dari larutan H_2O_2 . Kebanyakan bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Uji katalase dilakukan dengan menggunakan larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%. Uji katalase dilakukan pada isolat bakteri yang telah diregenerasi. Adanya gelembung menunjukkan apabila bakteri merupakan katalase positif dan bakteri merupakan golongan katalase negatif apabila tidak menghasilkan gelembung udara (Benson., 2001).

2.6. Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim adalah kemampuan suatu enzim dalam mengubah substrat menjadi produk. Enzim lipase dapat diukur aktivitasnya dengan pengamatan terhadap pelepasan asam lemak atau gliserol. Pengukuran asam lemak dapat ditentukan secara kualitatif dan kuantitatif (Gupta *et al*, 2003). Metode kuantitatif yang banyak digunakan untuk mengukur aktivitas lipase adalah metode titrimetri. Metode titrimetri banyak digunakan karena hasilnya yang akurat dan prosesnya yang efisien. Asam lemak bebas yang terbentuk pada saat hidrolisis larutan akan bereaksi dengan larutan basa, dengan asumsi bahwa jumlah basa yang digunakan pada saat titrasi sama dengan jumlah asam lemak bebas yang dihidrolisis oleh enzim lipase dalam larutan (Fatchun., 2014).

Substrat yang biasa digunakan dalam uji aktivitas lipase adalah minyak zaitun. Minyak zaitun mengandung trigliserida berupa trioleogliserol dengan rumus molekul $(C_{17}H_{35}COO)_3C_3H_5$ dengan berat molekul sebesar 884 g/mol. Dalam proses inkubasi, trigliserol dalam minyak zaitun akan dihidrolisis oleh lipase menjadi asam lemak $(C_{17}H_{34}COOH)$ dan gliserol $(C_3H_5(OH)_3)$. Minyak zaitun dapat digunakan sebagai sumber karbon dengan alasan karena sebagian besar minyak nabati mudah dimetabolisme oleh mikroorganisme (Rizcikal., 2017).

Prinsip dari metode titrimetri yaitu mengukur pembentukan asam lemak bebas yang dititrasi dengan larutan basa berkonsentrasi rendah. Jumlah basa yang digunakan selama titrasi sama dengan jumlah asam lemak bebas yang terhidrolisis oleh lipase. Larutan basa yang digunakan adalah Natrium Hidroksida (NaOH). Banyaknya NaOH yang dapat berikatan dengan asam lemak menunjukkan banyaknya asam lemak yang terdapat dalam larutan sebagai hasil hidrolisis minyak zaitun oleh lipase. Perhitungan aktivitas lipase dilakukan berdasarkan rumus berikut (Candra, 2015):

$$\text{Aktivitas Lipase (U/mL)} : \frac{(A-B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{VE \times 60}$$

Keterangan :

A = Volume (ml) NaOH untuk titrasi sampel

B = Volume (ml) NaOH untuk titrasi blanko

1000 = Konversi mol ke μmol

60 = Waktu inkubasi

VE = Volume enzim

Volume titrasi NaOH (A) menunjukkan banyaknya lemak yang diubah menjadi asam lemak bebas. Blanko (B) berisi sama dengan larutan yang diuji,

namun ekstrak kasar diganti dengan akuades. Nilai konversi standar bagi aktivitas enzim adalah μmol , sehingga volume harus dikalikan dengan 1000. Volume enzim (VE) yang diuji sebanyak 1 mL. Waktu inkubasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 60 menit.

2.7. Uji *Total Plate Count* (TPC)

Penentuan jumlah bakteri dalam sampel dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Prinsip dari TPC adalah menunjukkan jumlah mikroba pada sampel dengan cara menghitung koloni bakteri yang tumbuh pada media agar. Sampel hasil peremajaan diambil untuk dilakukan pengujian TPC. Sampel diencerkan secara bertingkat dengan menggunakan larutan garam fisiologis NaCl 0,85%. Pengenceran merupakan faktor penting dalam pengujian menggunakan metode TPC. Pengenceran bertujuan untuk mengurangi jumlah mikroba dalam sampel sehingga terbentuk koloni yang lebih terpisah.

Satu mililiter suspensi sel pada pengenceran 10^{-9} diambil untuk selanjutnya dituangkan dalam cawan petri. Cawan yang telah berisi suspensi kemudian ditambahkan media MRS agar untuk pertumbuhan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati dan dicatat untuk kemudian dihitung koloni yang tumbuh atau *Colony Forming Unit* (CFU) (Merisa, 2015).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berjudul “**Skrining Bakteri Asam Laktat Lipolitik Hasil Isolasi dari Susu Kacang Tanah Terfermentasi**” dilakukan pada bulan Juli 2020 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat gelas standar, timbangan analitik, spatula, stirer, *hot plate*, botol semprot, cawan petri, jarum ose, bunsen, korek api, oven, autoklaf, *Laminar Air Flow (LAF)*, inkubator, *shaker*, *sentrifuge*, *vortex*, tabung makro, preparat, mikropipet, spektrofotometer UV-Vis, mikroskop, buret dan statif.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel berupa isolat dengan kode B, C, D, K dan L, akuades, alkohol 70% sebagai desinfektan, media MRSA (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*), MRSB (*Rogosa and Sharpe Broth*), NaCl, buffer pH 7, aseton, etanol, aluminium foil, plastik tahan panas, plastik wrap, rhodamin B, alkohol 96%, kristal violet, safranin, iodin, minyak zaitun, spirtus, NaOH, indikator *Phenolptalein* (pp).

3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan adalah skrining bakteri asam laktat lipolitik. Skrining dilakukan dengan menggunakan media *de Man Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA) yang ditambahkan dengan minyak zaitun dan Rhodamin B. Hasil skrining kemudian diuji aktivitasnya menggunakan metode titrimetri dengan larutan NaOH sebagai titer dan phenolphthalein (pp) sebagai indikator.

3.4. Tahapan Penelitian

1. Preparasi Alat dan Bahan
2. Pembuatan Media
3. Regenerasi Bakteri
4. Konfirmasi Bakteri Asam Laktat
5. Skrining Bakteri Asam Laktat Lipolitik
6. Pembuatan Inokulum dan Produksi Enzim
7. Uji Aktivitas Enzim Lipase
8. Pengukuran TPC (*Total Plate Count*)
9. Analisis Data

3.5. Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Preparasi Alat dan Bahan

Alat gelas yang digunakan untuk penelitian dicuci bersih dan dikeringkan kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama ± 15 menit.

3.5.2 Pembuatan Media

3.5.2.1 Media MRSA (*de Man Rogosa and Sharpe Agar*)

Media MRSA ditimbang sebanyak 6,82 gr kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga mendidih dan larut sempurna. Media kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm pada suhu 121⁰C selama \pm 15 menit. Kemudian, media dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptis. Media MRSA miring dibuat dengan cara memasukkan MRSA steril ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan menggunakan kapas dan plastik wrap. Media kemudian didinginkan dalam keadaan miring sampai memadat. Media MRSA miring digunakan sebagai media regenerasi bakteri.

3.5.2.2 Media MRSA-CaCO₃

Media MRSA ditimbang sebanyak 6,82 gr kemudian dilarutkan dan dipanaskan dalam 100 mL akuades hingga mendidih dan larut. Setelah larut media kemudian ditambahkan dengan serbuk CaCO₃ 0,5% dan diaduk menggunakan stirer. Media MRSA-CaCO₃ kemudian disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm pada suhu 121⁰C selama \pm 15 menit. Media kemudian dituang ke dalam cawan steril dan didinginkan sampai memadat.

3.5.2.3 Media MRSB (*de Man Rogosa and Sharpe Broth*)

Media MRSB ditimbang sebanyak 5,225gr kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga mendidih dan larut. Media disterilkan dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm pada suhu 121⁰C selama \pm 15 menit. Media MRSB digunakan untuk pembuatan inokulum.

3.5.3 Regenerasi Bakteri

Isolat bakteri diregenerasi dengan menggunakan media miring MRSA. Isolat diambil dengan menggunakan jarum ose dan diinokulasikan ke dalam media miring secara aseptis. Media berisi isolat diinkubasi dengan menggunakan inkubator pada suhu 37⁰C selama 48 jam. Setelah 48 jam media kemudian disimpan dalam lemari pendingin.

3.5.4 Konfirmasi Bakteri Asam Laktat

3.5.4.1 Pembentukan Zona Bening pada Media MRSA-CaCO₃

Isolat bakteri hasil regenerasi diinokulasikan secara aseptis dengan menggunakan jarum ose ke media MRSA-CaCO₃ di dalam cawan. Cawan yang berisi isolat bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 48 jam. Zona bening yang dihasilkan oleh bakteri kemudian diamati setelah waktu inkubasi 48 jam.

3.5.4.2 Pewarnaan Gram

Isolat bakteri diambil sedikit dengan menggunakan jarum ose dan digoreskan pada gelas objek yang telah ditetesi dengan akuades steril, gelas objek difiksasi diatas api bunsen hingga kering. Gelas objek ditetesi dengan kristal violet dan didiamkan selama 60 detik kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan difiksasikan di atas api bunsen. Kemudian gelas objek ditetesi dengan larutan iodine dan didiamkan selama 60 detik, dibilas dengan air mengalir dan difiksasikan di atas api bunsen. Gelas objek dibilas dengan alkohol 96% dan ditetesi dengan safranin didiamkan selama 45 detik, kemudian dibilas dengan air mengalir dan

dikeringkan. Gelas objek diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Bakteri Gram positif menghasilkan warna ungu dan bakteri Gram negatif menghasilkan warna merah saat dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop.

3.5.4.3 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan menggunakan reagen hidrogen peroksida (H_2O_2) 3%. Isolat bakteri diambil sedikit dengan menggunakan jarum ose secara aseptis dan diletakkan pada gelas objek yang telah diusap dengan alkohol steril. Isolat ditetesi dengan larutan H_2O_2 3% sebanyak 2-3 tetes dan diamati gelembung gas yang muncul. Gelembung gas menandakan uji katalase positif dan katalase negatif ditandai dengan tidak munculnya gelembung (Sharah dkk., 2015).

3.5.5 Skrining Kualitatif Bakteri Asam Laktat Lipolitik

Skrining dilakukan dengan menggunakan media selektif yaitu media MRSA yang telah ditambahkan dengan minyak zaitun 1% (b/v) dan Rhodamin B 1% (b/v). Isolat diinokulasikan pada bagian tengah media dalam cawan petri secara aseptis. Media kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam. Isolat merupakan bakteri lipolitik apabila terdapat zona bening ketika diamati di bawah sinar UV (Telussa, 2013).

3.5.6 Pembuatan Inokulum

Isolat bakteri diinokulasikan secara aseptis ke dalam 20 ml media cair MRSB. Media berisi isolat bakteri kemudian dishaking menggunakan shaker

dengan kecepatan 100 rpm selama 18 jam pada suhu ruang. Setelah dishaker nilai *Optical Density* (OD) inokulum diukur dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis pada panjang gelombang 600nm. Nilai OD disetarakan dengan cara diencerkan sampai bernilai 0,5 (Telussa, 2013).

3.5.7 Produksi Enzim Lipase

Inokulum yang telah memiliki nilai OD 0,5 kemudian diambil sebanyak 2 mL dan diinokulasikan ke dalam 20 mL media MRSB yang telah ditambahkan dengan minyak zaitun. Media kemudian dishaking dengan shaker pada kecepatan 100 rpm selama 18 jam. Inokulum yang telah diinkubasi disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan antara sel bakteri dengan enzim. Filtrat yang dihasilkan dari proses sentrifugasi merupakan ekstrak kasar enzim.

3.5.8 Uji Aktivitas Enzim Lipase

Uji aktivitas enzim lipase dilakukan dengan mengambil 1 mL ekstrak kasar enzim kemudian ditambahkan dengan minyak zaitun steril sebanyak 1 ml, dan buffer fosfat pH 7 sebanyak 2 ml. Campuran kemudian divortex agar tercampur dengan baik dan diinkubasi pada suhu 37⁰C, selama 60 menit. Setelah diinkubasi, ditambah larutan aseton:etanol (1:1) sebanyak 5 ml dan diberi 2 tetes indikator phenolphthalein (pp). Campuran kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,03N hingga mulai berubah warna menjadi pink pucat. Penambahan NaOH dihentikan apabila campuran larutan sudah tidak berubah warna ketika

didiamkan selama 30 detik. Aktivitas lipase dapat dihitung dengan cara sebagai berikut (Candra, 2015) :

$$\text{Aktivitas Lipase (U/mL)} : \frac{(A-B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{VE \times 60}$$

Keterangan :

A = Volume (ml) NaOH untuk titrasi sampel

B = Volume (ml) NaOH untuk titrasi blanko

1000 = Konversi mmol ke μmol

60 = Waktu inkubasi

VE = Volume enzim

3.5.9 Pengukuran *Total Plate Count* (TPC)

Pengukuran jumlah koloni atau *Total Plate Count* (TPC) dilakukan dengan menggunakan metode pour plate atau metode tuang. Kultur bakteri pada mulanya diencerkan dengan metode pengenceran bertingkat. Pengenceran dilakukan dengan cara kultur bakteri diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan NaCl 0,85%. Kultur hasil pengenceran 10^{-6} sampai 10^{-9} dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri steril. Media MRSA steril dituangkan ke kultur yang ada di cawan. Campuran media dan kultur kemudian digoyang perlahan agar tercampur. Media yang telah berisi kultur diinkubasi dengan menggunakan inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh diamati dan dihitung untuk mengetahui jumlah koloni yang tumbuh atau *Colony Forming Unit* (CFU). Perhitungan jumlah bakteri dilakukan dengan cara berikut:

$$\text{Jumlah bakteri} = \text{jumlah koloni} \times \text{faktor pengenceran (fp)}$$

3.5.10 Analisis Data

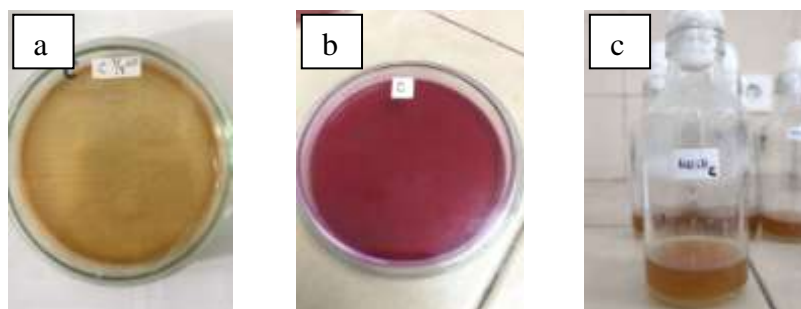
Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan metode deskriptif. Data yang digunakan merupakan data hasil karakterisasi bakteri asam laktat dan hasil uji aktivitas enzim lipase. Data tersebut kemudian dianalisa dan dilengkapi dengan tabel dan gambar.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Media *de Man Rogosa Agar* (MRSA) dan *de Man Rogosa Broth* (MRSB)

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah media *de Man Rogosa Sharpe* atau yang biasa disebut dengan MRS. Menurut Subagiyo (2015), MRS merupakan media selektif yang biasa digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri asam laktat. Media MRS yang digunakan dalam penelitian ini ada dua macam yaitu media MRS agar (MRSA) sebagai media padat dan media MRS broth (MRSB) sebagai media cair. MRSA digunakan sebagai media untuk regenerasi bakteri dan media pertumbuhan pada perhitungan total koloni bakteri. Skrining kualitatif bakteri asam laktat lipolitik menggunakan media padat MRS yang telah ditambahkan dengan minyak zaitun dan Rhodamin B. MRS cair digunakan pada proses pembuatan inokulum. Sedangkan media yang digunakan pada produksi enzim adalah media MRSB yang telah ditambahkan dengan minyak zaitun. Media yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4.1.



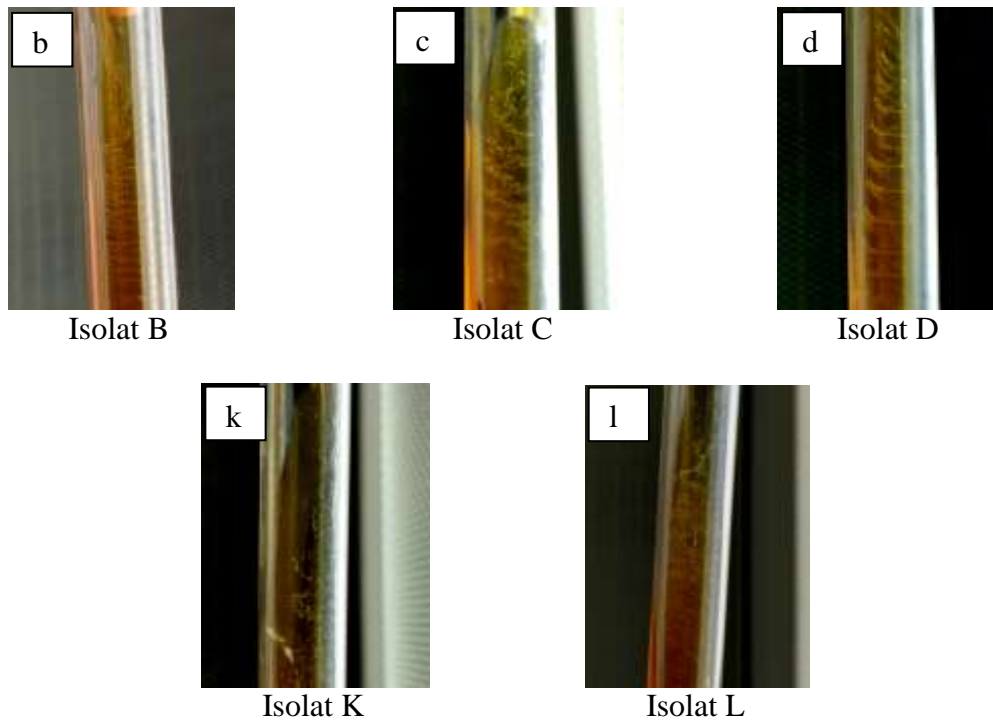
Gambar 4.1 Media yang digunakan pada penelitian a) Media MRSA, b) Media MRSA-Rhodamin B, c) Media MRSB

Konfirmasi bakteri asam laktat dilakukan dengan menggunakan media MRSA yang telah ditambahkan dengan CaCO_3 . Media MRSA yang digunakan pada proses regenerasi tidak ditambahkan dengan minyak zaitun karena hanya berfungsi sebagai media berkembang biak dari bakteri asam laktat. Minyak zaitun yang ditambahkan pada media padat MRS berfungsi sebagai substrat yang akan diuraikan oleh bakteri asam laktat lipolitik. Skrining bakteri asam laktat lipolitik kualitatif dilakukan dengan menggunakan media MRSA yang telah ditambahkan dengan minyak zaitun dan Rhodamin B. Penambahan Rhodamin B digunakan sebagai indikator fluoresensi untuk bakteri lipolitik. Penambahan Rhodamin B pada media skrining dilakukan dengan mengacu pada penelitian Telussa (2013). Berdasarkan penelitian tersebut, diketahui apabila pendaran dihasilkan dari sampel ketika diletakkan di bawah lampu UV dengan inkubasi pada suhu 37°C dengan inkubasi selama 3 hari.

4.2. Regenerasi Bakteri

Regenerasi bakteri atau peremajaan bakteri dilakukan agar bakteri mendapatkan nutrisi yang lebih baik sehingga, diperoleh bakteri dengan kemampuan tumbuh yang baik. Peremajaan bakteri dilakukan secara aseptis untuk menghindari adanya kontaminasi dari bakteri lain. Masing-masing isolat yang diregenerasi adalah isolat B, C, D, K dan L. Inokulasi bakteri dilakukan dengan menggoreskan isolat pada permukaan media miring MRSA. Teknik gores merupakan teknik yang paling praktis dan sederhana untuk mengamati bakteri yang tumbuh pada media (Machmud, 2001). Regenerasi bakteri dilakukan secara berkala agar isolat bakteri yang digunakan selalu dalam keadaan *fresh* dan baru.

Peremajaan secara berkala juga dapat memperpanjang waktu penyimpanan dari isolat bakteri. Media berisi isolat dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil regenerasi isolat

Lima isolat (B, C, D, K dan L) yang ditanamkan pada media miring MRSA tumbuh setelah inkubasi selama 48 jam. Penanaman isolat pada media miring MRSA dilakukan karena dinilai praktis dan efektif. Pertumbuhan isolat bakteri ditandai dengan adanya bercak putih yang tumbuh diatas permukaan media miring MRSA. Bercak putih yang dihasilkan merupakan kumpulan koloni bakteri. Koloni yang tumbuh pada media miring menandakan apabila bakteri masih dalam keadaan baik dan dapat digunakan untuk perlakuan selanjutnya.

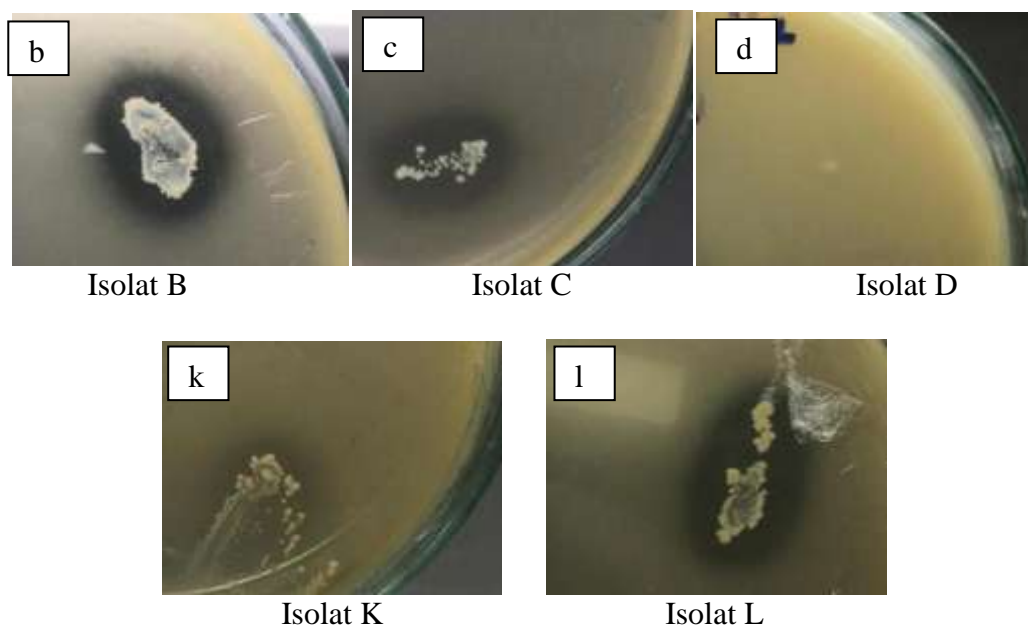
4.3. Konfirmasi Bakteri Asam Laktat

Konfirmasi bakteri asam laktat bertujuan untuk memastikan apakah bakteri yang tumbuh merupakan bakteri asam laktat dan bukan bakteri lain.

Konfirmasi dilakukan dengan menggunakan media selektif untuk bakteri asam laktat yaitu media MRSA yang ditambahkan 0,5% CaCO_3 . Isolat dikatakan merupakan golongan bakteri asam laktat apabila dapat menghasilkan zona bening disekitaran koloni ketika ditanamkan pada media MRSA- CaCO_3 . Pengamatan secara mikroskopis juga dilakukan dengan metode pewarnaan Gram dan uji Katalase. Bakteri asam laktat merupakan bakteri Gram positif dan tidak akan bereaksi apabila dilakukan pengujian dengan menggunakan Katalase.

4.3.1 Pembentukan Zona Bening pada Media MRSA- CaCO_3

Media MRS merupakan media selektif yang biasa digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri asam laktat (Khunajarkr *et al*, 2008). Gula yang dikonsumsi oleh sel bakteri akan disederhanakan menjadi asam organik berupa asam laktat. Asam laktat yang terbentuk akan berikatan dengan CaCO_3 dalam media dan akan membentuk zona bening (Nurmalinda, 2013).



Gambar 4.3.1 Zona bening pada media MRSA- CaCO_3

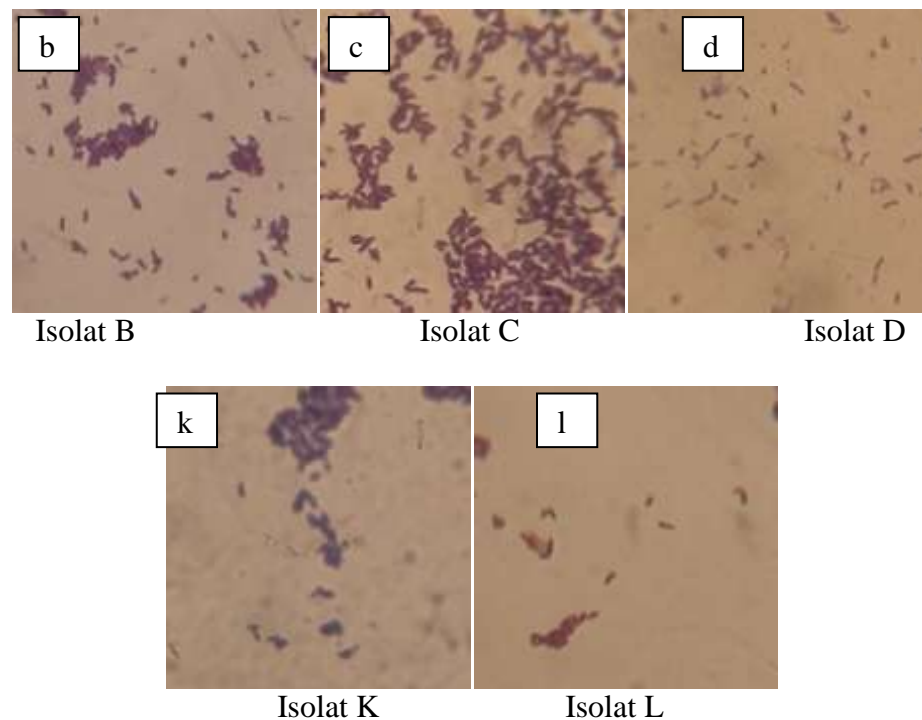
Berdasarkan Gambar 4.3.1, isolat B, C, K dan L menunjukkan zona bening yang jelas di sekitaran koloni bakteri. Sedangkan, zona bening yang dihasilkan pada isolat D samar-samar dan terkesan tidak terlihat. Kecilnya ukuran zona bening dapat disebabkan karena bakteri asam laktat yang dihasilkan oleh isolat sangat sedikit. Zona bening terbentuk akibat adanya reaksi antara asam laktat di dalam bakteri dengan CaCO_3 yang terkandung di dalam media. Gula yang dikonsumsi oleh bakteri akan disederhanakan menjadi asam organik berupa asam laktat (Nurmalinda, 2013). Asam laktat yang dihasilkan oleh bakteri akan menghidrolisis CaCO_3 sehingga membentuk kalsium laktat sebagai produk akhir dari reaksi (Sumual, 2019; Sun, 2014).

4.3.2 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui karakter isolat berdasarkan pada struktur dinding sel bakteri. Pewarnaan Gram merupakan salah satu uji penting yang harus dilakukan untuk mengidentifikasi apakah isolat bakteri termasuk dalam golongan bakteri asam laktat atau bukan (Amaliah, 2018).

Tabel 4.3.2 Hasil pewarnaan Gram

| Isolat | Gram | Bentuk |
|--------|------|--------|
| B | + | Batang |
| C | + | Batang |
| D | + | Batang |
| K | + | Batang |
| L | + | Batang |



Gambar 4.3.2 Hasil pewarnaan Gram isolat susu kacang tanah terfermentasi

Hasil pewarnaan isolat B, C, D, K dan L menunjukkan warna ungu pada masing-masing isolat. Warna ungu yang dihasilkan menandakan apabila isolat dari susu kacang tanah terfermentasi merupakan bakteri Gram positif. Menurut Sun *et al* (2014), bakteri asam laktat termasuk dalam golongan bakteri Gram positif. Pernyataan tersebut didukung dengan penelitian Amaliah dkk (2018), bakteri asam laktat yang diisolasi dari limbah cair rendaman kedelai memiliki ciri Gram positif dengan hasil pengecatan Gram berwarna ungu. Penelitian lain yang dilakukan pada Tempe juga menunjukkan hasil Gram positif pada pewarnaan Gram (Pisol, 2015).

Prinsip dari pewarnaan Gram adalah adanya ikatan ionik yang terjadi diantara senyawa aktif pewarna (kromogen) dengan sel yang terdapat di dalam dinding bakteri (Umsl, 2008). Zat pewarna yang digunakan dalam pewarnaan

Gram umumnya terdiri atas ion positif dan ion negatif. Warna pada ion positif (zat pewarna⁺ Cl⁻) terdapat pada zat yang bersifat basa dan warna pada ion negatif (zat pewarna⁻ Na⁺) terdapat pada zat yang bersifat asam (Volk dkk., 1999).

Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan peptidoglikan pada bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki peptidoglikan dengan tebal 20-80 nm sedangkan pada bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan dengan tebal 2-7 nm. Kristal violet akan masuk ke dalam dinding sel bakteri. Ketika sel ditambahkan dengan iodine maka reagen kristal violet akan berikatan dengan iodine sehingga membentuk kompleks di-iodine. Terbentuknya ikatan antara kristal violet dengan iodine akan menambah ukuran molekul. Pada proses ini baik bakteri Gram positif atau Gram negatif akan menunjukkan warna ungu saat diamati menggunakan mikroskop.

Dekolorisasi dilakukan dengan menggunakan alkohol 96%. Alkohol dapat menyebabkan peptidoglikan pada dinding sel bakteri menyusut (Ismail., 2017). Pada Gram negatif, peptidoglikan yang tipis menyebabkan warna dari kristal violet menghilang. Sedangkan pada Gram positif warna akan tetap bertahan karena terhalang oleh lapisan peptidoglikan. Penambahan reagen safranin akan menggantikan warna ungu dari kristal violet. Oleh sebab itu, bakteri Gram positif berwarna ungu dan bakteri Gram negatif akan berwarna pink.

4.3.3 Uji Katalase

Uji katalase dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri memiliki enzim katalase. Isolat merupakan katalase positif apabila menghasilkan gelembung saat diujikan dengan H₂O₂. Hasil uji katalase dapat dilihat pada Tabel 4.3.3

Tabel 4.3.3 Hasil Uji Katalase

| Isolat | Katalase |
|--------|----------|
| B | - |
| C | - |
| D | - |
| K | - |
| L | - |



Isolat B



Isolat C



Isolat D



Isolat K



Isolat L

Gambar 4.3.3 Hasil uji katalase isolat bakteri asam laktat dari susu kacang tanah terfermentasi

Berdasarkan Gambar 4.3.3 isolat B,C,D K dan L tidak menghasilkan gelembung udara ketika ditetesi dengan menggunakan H_2O_2 sehingga tergolong dalam katalase negatif dan isolat bersifat bakteri anaerobik. Katalase negatif juga dihasilkan pada penelitian yang dilakukan oleh Amaliah (2018), bakteri asam laktat yang dihasilkan dari limbah cair rendaman kacang kedelai tidak menghasilkan gelembung ketika dilakukan uji katalase. Hasil katalase negatif juga

ditunjukkan pada penelitian yang dilakukan pada bakteri asam laktat yang dihasilkan dari fermentasi biji kakao (Ismail, 2017).

Tabel 4.3.4 Hasil Konfirmasi Bakteri Asam Laktat

| Isolat | Zona Bening | Pewarnaan Gram | Bentuk Sel | Katalase |
|--------|-------------|----------------|------------|----------|
| B | + | + | Batang | - |
| C | + | + | Batang | - |
| D | + | + | Batang | - |
| K | + | + | Batang | - |
| L | + | + | Batang | - |

Keterangan :

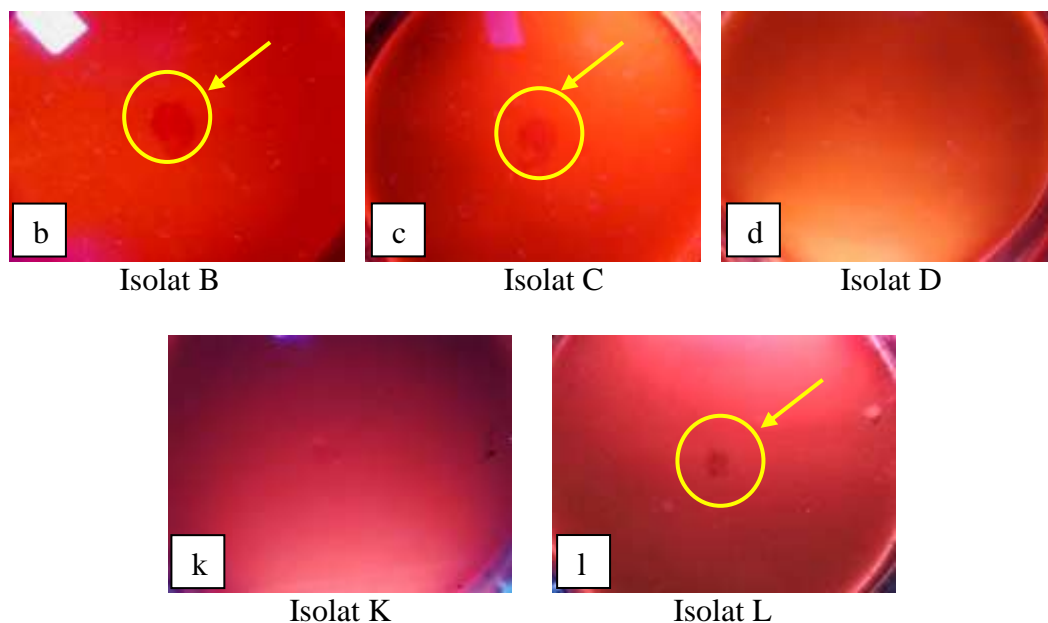
+ : Adanya pertumbuhan bakteri/hasil pewarnaan positif/hasil uji positif

- : Tidak adanya pertumbuhan bakteri/hasil pewarnaan negatif/hasil uji negatif

Berdasarkan Tabel 4.3.4 lima isolat bakteri yang disolasi dari susu kacang tanah terfermentasi merupakan bakteri asam laktat. Pernyataan tersebut didukung dengan adanya zona bening yang muncul disekitaran koloni bakteri pada media CaCO_3 , bakteri merupakan Gram positif dan menunjukkan katalase negatif. Hasil dari penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Amaliah dkk (2018), bakteri asam laktat dari limbah rendaman kacang kedelai memiliki ciri berupa katalase negatif dan Gram positif dengan bentuk sel batang. Bakteri asam laktat yang berasal dari saluran pencernaan kepiting bakau (*Scylla spp.*) juga memiliki ciri yang sama yaitu Gram positif, katalase negatif dan menghasilkan zona bening pada media MRSA-CaCO_3 .

4.4. Skrining Kualitatif Bakteri Asam Laktat Lipolitik

Skrining bakteri asam laktat lipolitik dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan media MRSA yang telah ditambahkan dengan minyak zaitun dan Rhodamin B.



Gambar 4.4 Hasil skrining isolat bakteri asam laktat lipolitik

Hasil skrining menunjukkan apabila isolat dari hasil isolasi susu kacang tanah terfermentasi mampu menghasilkan bakteri asam laktat dengan aktivitas lipolitik. Pendaran yang dihasilkan memiliki ukuran yang berbeda-beda sesuai dengan kemampuan lipolitiknya. Pendaran terjadi akibat adanya ikatan antara asam lemak yang dihasilkan oleh minyak zaitun, dengan Rhodamin B yang terkandung di dalam media. Asam palmitat yang terkandung di dalam minyak zaitun akan dihidrolisis oleh enzim lipase menjadi asam lemak. Asam lemak hasil hidrolisis tersebut bereaksi dengan Rhodamin B sehingga menghasilkan pendaran di bawah sinar UV (Sugiharni., 2010).

| Tabel 4.4 Hasil uji kualitatif isolat | |
|---------------------------------------|-------------|
| Kode Isolat | Zona Bening |
| B | +++ |
| C | ++ |
| D | + |
| K | + |
| L | ++ |

Keterangan :

- + : Muncul sangat sedikit zona bening
- ++ : Muncul zona bening
- +++ : Muncul zona bening yang besar

Berdasarkan Tabel 4.4, kelima bakteri yang diuji pada penelitian ini mampu menghasilkan pendaran pada saat dilihat di bawah sinar UV. Hasil tersebut menunjukkan apabila bakteri asam laktat dari susu kacang tanah terfermentasi mampu menghasilkan enzim lipase. Pendaran yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat pada penelitian ini memiliki diameter yang lebih kecil apabila dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh penelitian lain. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Manvar and Sonwane (2019), bakteri *Lactobacillus* L₁₈ menghasilkan zona bening dengan diameter 27 mm. Hal tersebut dapat terjadi karena sumber yang digunakan untuk mendapatkan isolat berbeda, sehingga hasil yang diperoleh juga akan berbeda.

4.5. Pembuatan Inokulum dan Produksi Enzim

Pembuatan inokulum bertujuan sebagai starter dalam proses fermentasi. Media yang digunakan pada pembuatan inokulum adalah media MRS cair yaitu MRSB. Media MRS *broth* yang semula bening akan berubah menjadi keruh setelah dishaker selama 18 jam. Warna keruh menunjukkan adanya penambahan jumlah sel bakteri dalam media cair MRSB. Inokulum yang telah dishaker diukur nilai *Optical Density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Panjang gelombang 600-635 nm biasa digunakan untuk mengukur larutan yang berwarna kuning sampai coklat.

Nilai absorbansi sebanding dengan konsentrasi larutan atau jumlah sel bakteri yang dihasilkan oleh isolat (Febriyansari, 2014). Absorbansi yang

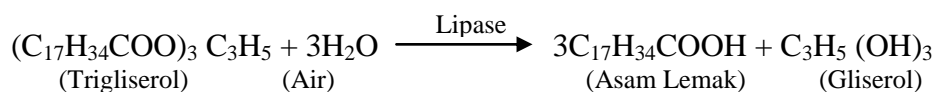
dihasilkan oleh masing-masing isolat dapat dilihat pada lampiran L.5.1. Berdasarkan data hasil absorbansi yang ditunjukkan pada lampiran L.5.1 nilai OD yang dari masing-masing isolat berbeda-beda, sehingga perlu dilakukan penyetaraan. Penyetaraan dilakukan agar jumlah bakteri yang akan digunakan dalam media dapat dianggap setara dan memiliki jumlah bakteri awal yang sama. Penyetaraan nilai OD dilakukan dengan mengencerkan inokulum stok menggunakan media MRSB steril. Pemindahan inokulum bakteri harus dilakukan secara aseptis untuk menghindari kontaminasi dari bakteri lain yang tidak diinginkan.

Produksi enzim lipase dilakukan dengan menggunakan inokulum yang memiliki nilai OD 0,5. Media yang digunakan adalah media MRSB yang telah ditambahkan dengan minyak zaitun steril. Minyak zaitun berfungsi sebagai sumber karbon dan substrat yang akan dihidrolisis oleh enzim lipase dalam sampel. Shaker media dilakukan selama 18 jam karena pada jam tersebut merupakan waktu yang optimum bagi sel bakteri untuk membelah diri. Proses pemisahan antara ekstrak kasar enzim dan sel bakteri dilakukan dengan menggunakan sentrifugasi. Prinsip dasar dari sentrifugasi adalah pemisahan antara dua senyawa berdasarkan berat jenis dari masing-masing senyawa. Enzim lipase terdapat pada cairan bening (filtrat) dan sel bakteri akan mengendap dibawah.

4.6. Uji Aktivitas Enzim Lipase Secara Kuantitatif

Uji aktivitas enzim lipase dilakukan untuk mengetahui aktivitas lipase yang dihasilkan oleh isolat bakteri asam laktat dari susu kacang tanah terfermentasi. Ekstrak kasar enzim lipase yang digunakan diperoleh dari proses

produksi enzim. Minyak zaitun ditambahkan pada ekstrak kasar enzim sebagai substrat yang akan dihidrolisis oleh enzim lipase. Menurut Telussa (2013), asam palmitat yang terdapat didalam minyak zaitun akan dihidrolisis oleh enzim lipase yang dihasilkan oleh bakteri sehingga menjadi produk berupa asam lemak berwarna kuning. Reaksi hidrolisis trigliserida oleh enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 4.6.1



Gambar 4.6.1 Reaksi hidrolisis triasilgliserol oleh lipase (Pramiadi dkk., 2014)

Perubahan minyak zaitun menjadi asam lemak selama proses hidrolisis dapat menurunkan nilai pH larutan sehingga perlu ditambahkan buffer untuk menjaga pH larutan. Buffer yang digunakan pada penelitian ini yaitu buffer fosfat pH 7. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Asih (2011) diketahui bahwa lipase yang dihasilkan oleh bakteri memiliki pH optimum 7 dengan minyak zaitun sebagai substratnya. Agar enzim lipase dapat menghidrolisis minyak zaitun dengan baik, maka dilakukan inkubasi pada suhu 37⁰C selama 60 menit. Waktu 60 menit merupakan waktu yang dinilai optimum untuk enzim lipase dalam menghidrolisis lemak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sumarlin (2017).

Campuran enzim dan substrat (minyak zaitun) dinaktifkan dengan menambahkan larutan aseton:etanol (1:1). Indikator enzim lipase yang digunakan pada penelitian ini adalah indikator *phenolphthalein* (pp). Indikator *phenolphthalein* (pp) adalah asam diprotik yang tidak berwarna. Mula-mula indikator pp tidak akan berwarna kemudian indikator pp akan kehilangan hidrogen dan menjadi ion dengan sistem terkonjugasi sehingga dihasilkan warna merah.

Akhir dari proses titrasi ditandai dengan munculnya warna merah muda pada larutan sampel. Warna yang dihasilkan tidak berubah apabila didiamkan selama 30 detik. Warna merah muda yang dihasilkan dikarenakan pH larutan mengalami kenaikan sehingga NaOH yang terdapat dalam larutan sudah tidak bisa berikatan dengan asam lemak dan larutan akan bersifat basa. Hasil uji aktivitas dari masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel 4.6

Tabel 4.6 Aktivitas Enzim Lipase pada Masing-masing Isolat

| Isolat | Rata-rata Aktivitas Enzim (U/mL) |
|--------|----------------------------------|
| B | 4,05 |
| C | 4,025 |
| D | 3,738 |
| K | 3,663 |
| L | 3,875 |

Berdasarkan Tabel 4.6 hasil aktivitas enzim tertinggi dihasilkan oleh isolat B yaitu 4,05 U/mL dan aktivitas terendah dihasilkan oleh isolat K yaitu 3,663 U/mL. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Guan *et al* (2020), terdapat aktivitas lipolitik pada *Lactobacillus casei* hasil isolasi dari Vinasse dengan aktivitas sebesar 17,79 U/mL. Bakteri *Lactobacillus* L₁₈ juga berhasil diisolasi dari industri susu dengan aktivitas lipase sebesar 5,47 U/mL (Manvar and Sonwane., 2019).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan apabila nilai aktivitas enzim lipase dari isolat susu kacang tanah terfermentasi lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas lipase pada penelitian Guan *et al* (2020). Aktivitas lipase pada penelitian ini, mendekati dengan hasil penelitian Manvar and Sonwane (2019). Perbedaan aktivitas enzim lipase disebabkan oleh perbedaan sumber bakteri. Susu sapi memiliki kandungan lemak yang lebih tinggi dibandingkan dengan kacang tanah,

sehingga kandungan enzim lipase yang dihasilkan juga akan lebih tinggi dari kacang tanah.

4.7. Viabilitas Bakteri Asam Laktat

Perhitungan sel bakteri dilakukan untuk mengetahui jumlah koloni bakteri yang dapat hidup. Jumlah sel bakteri dihitung dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). TPC merupakan salah satu teknik untuk mengetahui cemaran mikroba yang dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran dan cawan tuang (Dwijoseputro, 2005). Pengukuran TPC dilakukan pada dua isolat dengan aktivitas enzim tertinggi yaitu isolat B dan isolat C. Koloni yang tumbuh pada media memiliki koloni berwarna putih dengan bentuk bulatan kecil dengan ukuran yang berbeda-beda. Koloni memiliki besar yang relatif sama dan tersebar merata di seluruh permukaan media. Hasil perhitungan koloni bakteri yang hidup dapat dilihat pada Tabel 4.7

| Tabel 4.7 Hasil Pengukuran <i>Total Plate Count</i> (TPC) | |
|---|-----------------------------------|
| Isolat Bakteri | Rata-rata jumlah bakteri (CFU/mL) |
| B | $1,54 \times 10^8$ |
| C | $1,45 \times 10^8$ |

Berdasarkan Tabel 4.7, rata-rata jumlah bakteri yang dihasilkan oleh isolat B sebesar $1,54 \times 10^8$ CFU/mL dan pada isolat C rata-rata jumlah bakteri sebesar $1,45 \times 10^8$ CFU/mL. Hasil tersebut lebih rendah apabila dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Amaliah (2018). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa bakteri asam laktat dari limbah kacang kedelai menghasilkan nilai TPC sebesar $9,17 \times 10^8$ CFU/mL. Nilai TPC yang rendah disebabkan oleh kondisi lingkungan yang berbeda pada saat dilakukan penelitian sehingga hasil

yang diperoleh juga berbeda. Sumber isolat bakteri juga dapat mempengaruhi kemampuan hidup dari koloni bakteri.

4.8. Pemanfaatan Susu Kacang Tanah Terfermentasi untuk Produksi Bakteri Asam Laktat Lipolitik dalam Perspektif Islam

Allah Swt telah menciptakan bumi dan seisinya sebagai nikmat bagi makhluk hidup didalamnya tanpa pengecualian. Setiap ciptaan-Nya mengandung unsur kekuasaan Allah, dari yang terlihat sampai yang tidak terlihat. Nikmat Allah bagi manusia sangatlah luas dan tidak terbatas ukurannya sesuai dengan firman Allah pada surat Yasin ayat 33:

وَايَةٌ لَهُمُ الْأَرْضُ الْمَيِّتَةُ ۚ أَحْيَيْنَاهَا وَأَخْرَجْنَا مِنْهَا حَبًّا فَمِنْهُ يَأْكُلُونَ

“Dan suatu tanda (kebesaran Allah) bagi mereka adalah bumi yang mati (tandus). Kami hidupkan bumi itu dan Kami keluarkan darinya biji-bijian, maka dari (biji-bijian) itu mereka makan”(Q.S Yasin : 33)

Tafsir Ibnu Katsir menjelaskan bahwa dari air hujan yang diturunkan Allah telah menyuburkan tanah dan menumbuhkan beraneka macam tumbuhan dengan subur. Dan dari ayat tersebut diketahui bahwa Allah memiliki kekuasaan yang besar dalam kehidupan manusia sehingga dapat menghidupkan tumbuhan dari biji yang mati dengan cara menurunkan air hujan dari langit. Air hujan tersebut kemudian menyuburkan tumbuhan sehingga manusia dan makhluk hidup lainnya mendapatkan rezeki berupa sumber makanan. Disamping itu, tumbuhan tersebut dapat pula dijadikan bahan perniagaan untuk diperdagangkan oleh manusia.

Tumbuhan yang dimaksudkan dalam ayat ini adalah biji-bijian dengan berbagai macam bentuk dan jenis. Biji-bijian ini banyak dimanfaatkan manusia

sebagai bahan makanan dan pakan bagi hewan ternak. Salah satu biji-bijian dengan jumlah melimpah adalah kacang tanah. Kacang tanah merupakan tumbuhan yang dapat dijumpai dimanapun diseluruh pelosok negeri. Kandungan lemak yang tinggi dalam kacang tanah memiliki potensi besar dalam menghasilkan bakteri penghasil enzim lipase. Sebagai manusia yang tunduk pada perintah Allah sudah sewajibnya kita mempelajari apa yang terkandung dalam kacang tanah agar dapat meningkatkan kualitas dan gizi dari kacang tanah. Seperti yang telah dituliskan dalam Quran surat Al- Baqarah ayat 26:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا

“Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu” (Q.S Al Baqarah:26)

Menurut tafsir Al-Munawwarah lafadz بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا (berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu) memiliki makna bahwa terdapat banyak makhluk hidup yang tidak dapat terlihat oleh mata manusia dan membutuhkan alat pembesar untuk dapat mengetahuinya. Ayat tersebut dapat menjadi dasar untuk kita umat manusia mempelajari makhluk mikro seperti bakteri agar dapat memberikan manfaat dalam kehidupan manusia. Penelitian ini membuktikan apabila susu kacang tanah yang telah difermentasi mengandung bakteri asam laktat. Bakteri tersebut juga telah diketahui dapat menghasilkan enzim lipase. Lipase yang dihasilkan juga telah dibuktikan dapat menghidrolisis lemak dengan uji aktivitas lipase yang dilakukan menggunakan substrat minyak zaitun.

Pemanfaatan kacang tanah sebagai bahan makanan terbaru masih sangat sedikit dalam masyarakat. Secara umum hanya diketahui sebagai bahan pangan pelengkap atau bahan pakan ternak. Identifikasi lipase yang berasal dari susu

kacang tanah terfermentasi merupakan suatu upaya yang dapat kita lakukan dalam mempelajari makhluk hidup ciptaan Allah. Memanfaatkan serta mempelajari tumbuhan juga merupakan bentuk lain perilaku baik manusia terhadap makhluk ciptaan Allah. Hal tersebut juga telah disinggung pada hadits riwayat Muslim:

عَنْ أَبِي يَعْلَى شَدَّادِ بْنِ أَوْسٍ رَضِيَ اللَّهُ تَعَالَى عَنْهُ عَنْ رَسُولِ اللَّهِ ﷺ قَالَ: (إِنَّ اللَّهَ كَتَبَ الْإِحْسَانَ عَلَى كُلِّ شَيْءٍ. فَإِذَا قَتَلْتُمْ فَأَحْسِنُوا الْقِتْلَةَ، وَإِذَا ذَبَحْتُمْ فَأَحْسِنُوا الذَّبْحَةَ، وَلِيُحَدِّثْ أَحَدُكُمْ شَفْرَتَهُ، وَلِيُرِخَ

Dari Abu Ya'la Syaddad bin Aus Radhiallallahu Ta'ala 'Anhu, dari Rasullullah Shallallahu 'Alaihi wa Sallam, Beliau bersabda: *"Sesungguhnya Allah menetapkan (mewajibkan) berbuat ihsan atas segala hal. Maka, jika kalian membunuh (dalam peperangan) maka lakukanlah dengan cara yang baik, jika kalian menyembelih maka lakukanlah sembelihan yang baik, hendaknya setiap kalian menajamkan parangnya, dan membuat senang hewan sembelihannya."* (HR. Muslim)

Hadist tersebut mengingatkan manusia tentang bagaimana etika yang seharusnya dilakukan terhadap sesama makhluk hidup. Agama islam juga mengajarkan manusia untuk selalu bijaksana dalam memanfaatkan apa yang ada di lingkungannya. Sikap ihsan terhadap makhluk ciptaan Allah dapat menjaga keseimbangan alam tempat tinggal manusia. Berdasarkan ayat dan hadits yang telah dijabarkan dengan melakukan identifikasi terhadap susu kacang tanah merupakan salah satu langkah baik yang bisa dilakukan untuk memanfaatkan sumber daya yang melimpah.

Bakteri asam laktat yang dihasilkan dari isolat susu kacang tanah terfermentasi dapat digunakan sebagai sumber penghasil enzim lipase. Enzim lipase yang dihasilkan dari bakteri asam laktat dapat digunakan sebagai pemecah minyak sehingga menjadi senyawa yang lebih sederhana. Penelitian ini telah membuktikan apabila tidak ada satupun makhluk yang diciptakan sia-sia tanpa

tujuan. Bakteri yang sangat kecil memiliki fungsi dan tujuan tertentu dalam penciptaanya. Enzim yang bahkan tidak dapat kita lihat wujudnya, memiliki peranan yang besar bagi kehidupan manusia. Penelitian ini juga membuktikan apabila dari kacang tanah yang terlihat sepele dan seringkali dianggap sebelah mata ternyata memiliki manfaat yang terkandung didalamnya. Sebagai manusia sudah selayaknya kita senantiasa mengingat Allah dalam kondisi apapun dan memikirkan penciptaan-Nya.

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Lima isolat yang diisolasi dari susu kacang tanah terfermentasi merupakan bakteri asam laktat yang dapat memproduksi enzim lipase. Aktivitas enzim lipase tertinggi dihasilkan oleh isolat B dengan nilai aktivitas lipase sebesar 4,05 U/mL sedangkan aktivitas terendah dimiliki oleh isolat K dengan nilai aktivitas lipase sebesar 3,663 U/mL. Isolat dengan aktivitas tertinggi kemudian diuji daya hidupnya dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Hasil uji TPC menunjukkan apabila isolat B memiliki nilai $1,54 \times 10^8$ CFU/mL dan isolat C sebesar $1,45 \times 10^8$ CFU/mL. Berdasarkan hasil dari penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat bakteri yang dihasilkan dari susu kacang tanah terfermentasi merupakan bakteri asam laktat yang memiliki aktivitas lipolitik.

5.2. Saran

Penelitian selanjutnya disarankan untuk mengidentifikasi jenis bakteri asam laktat yang dihasilkan oleh susu kacang tanah. Selain itu, variasi waktu produksi enzim juga dapat dilakukan untuk mengetahui waktu yang tepat dalam produksi enzim lipase oleh bakteri asam laktat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2003. *Tafsir Ibnu Katsir Jilid 5*. Bogor: Pustaka Imam asy-Syafi'i.
- Akhmetsadyokova, S; A Baubekova, G; Konuspeyeva, N Akhmetsadyokova; Faye, G. 2015. Lactic Acid Bacteria Biodiversity in Raw and Fermented Camel Milk, African. *J. Food Science Technology*. Volume 6: 84–88.
- Asih S. 2011. Karakterisasi enzim hidrolase bakteri dari mata air soda Parbubu, Tapanuli Utara. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Balya, M. 2011. Perbedaan Konsentrasi Subtrat Terhadap Lama Fermentasi pada Buah Murbei. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. I(1), 139-149.
- Baoet *al.* 2012. Predominant lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk products in the Sichuan Province of China. *Dairy Sci. Technol.* 92, 3: 309-319.
- Benson. 2001. Microbiological Applications. Laboratory Manual in General Microbiology. Eighth Edition. McGraw-Hill Science Company : New York. pp. 72-175.
- Bruno, L. M. (2011). Manual de curadores de germoplasma: microorganismos: bactérias ácido-lácticas. Brasília: EMBRAPA.
- Candra, N dan Suharjono. 2015. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolat Bakteri Lipolitik dari Limbah Cair Pabrik pengolahan Ikan Kecamatan Muncar, Banyuwangi. *Jurnal Biotropika*. Volume 3 (3).
- Demera, L; Barahona, P; dan Barriga, E. 2019. Production, Extraction and Characterization of Lipases from The Antarctic Yeast *Guehomyces Pullulans*. *J. Biochem. Biotechnol.* 15, 75–82.
- Dian, Valentina., B.P; Nursyirwani dan Effendi, I. 2013. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cincaluk and Tea Activity Against Bacteria *Vibrio alginolyticus* and *Aeromonas hydrophila*. Universitas Riau.
- Di Cagno, R; Coda, R; De Angelis, M; dan Gobbetti, M. 2013. Exploitation of Vegetables and Fruits Through Lactic Acid Fermentation. *Food Microbiology*. Vol. 33, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>.
- Dwidjoseputro, D. 1994. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.
- Esteban-Torres, *et al.* 2015. Characterization of a Halotolerant Lipase from the Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus plantarum* Useful In Food Fermentation. *Food Science Technology*. Volume 60:246-252.

- Febriyansari, A. N. 2014. Penerapan Model Gompertz pada Pertumbuhan Bakteri *L. Acidophilus* dan *B. Longun* di Media Adonan Es Krim (Ice Cream Mix atau ICM) Jenis Standar. [Skripsi]. Malang: Universitas Brawijaya.
- Filannino *et al.* 2020. Lactic Acid Fermentation Enriches the Profile of biogenic fatty acid derivatives of avocado fruit (*Persea americana* Mill.). *Food Chemistry*. 317, 126384.
- Flores, M dan Toldra, F. 2011. Microbial Enzymatic Activities for Improved Fermented Meats. *Trends in Food Science and Technology*, 22. 81-90.
- Guan, Chengran *et al.* 2020. Isolation of Novel *Lactobacillus* with Lipolytic Activity from The Vinasse and Their Preliminary Potential Using as Probiotics. *AMB Express*.
- Gupta, R; Pooja, R; Namita, G; dan Sapna Bradoo. 2003. Bacterial Lipases: An Overview of Production, Purification and Biochemical Properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. Volume 64:763-781.
- Han, Jet *et al.* 2014. Dextran Synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in Tomato Juice Supplemented with Sucrose. *Carbohydrate Polymers* Volume 112: 556-562
- Hardiningsih, R; Napitupulu dan Yulinery, T. 2006. Isolasi dan Uji Resistensi Beberapa Isolat *Lactobacillus* pada pH Rendah. *Biodiversitas*. 7 (1): 15-17.
- Helen T; De Oliveira D; Mazutti M.A; Di Luccio M and Oliveira J.V. 2010. A Review on Microbial Lipase Production. *Food Bioprocess Technol*. Volume 3: 182-196.
- Isas, A., S *et al.* 2020. Functional fermented cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) juice using autochthonous lactic acid bacteria. *Food Research International*. 138: 109729.
- Ismail, Y. S. 2017. Isolation, Characterization and Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria from The Fermented Cacao Seed (*Theobroma cacao* L.). *Bioleuser*. Volume 1 No. 2:45-53.
- Katz, M; Median, R; Gonzalez S and Oliver G. 2002. Esterolytic and Lipolytic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Ewe's Milk and Cheese. *Journal of Food Protection*. Volume 65(12): 1007-2001.
- Khunajakr, N; Wongwicham, D; Moonmangmee and S. Tantipaiboonvut. 2008. Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria Producing Antimicrobial Compounds From Pig Gastrointestinal Tracts. *KMITL Sci. Tech. J.* Volume 8 No. 1: 8-17.

- Knob, A. (2020). A Novel Lipolytic Yeast *Meyerozyma guilliermondii*: Efficient and Low-cost Production of Acid and Promising Feed Lipase Using Cheese Whey. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Volume 24: 101565.
- Kouker G and Jaeger K.E. 1987. Spesific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipase. *Appl Environt Microbial*. Volume 53:211-213.
- Laily, I; Rohula, U dan Esti, W. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Riboflavin dari Produk Fermentasi Sawi Asin. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. Volume 2 No.4: 179-184.
- Machmud, M. 2001. Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba. *Buletin AgroBio* 4(1):24-32.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko., D.A. Stahl dan D. Clark. 2011. Biology of Microorganisms Thirteenth Edition. Pearson Education International. USA. New York.
- Melliawati, C; Djohan and Yopi. 2015. Seleksi Bakteri Asam Laktat Sebagai Penghasil Enzim Protease. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiv Indonesia*. Halaman: 184-188.
- Manvar A.V. and Sonwane P.A. 2019. Lipolytic Activity of Lactic Acid Bacteria from Different Dairy Samples. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences*. 7(6), 47-52.
- Mobarak-Qamsari, E; Kasra-Kermanshahi, R and Moosavi-Nejad, Z. 2011. Isolation and Identification of a Novel, Lipase-producing Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *J. Microbiol*. Volume 3: 92–98.
- Muchtadi, T dan Ayustaningwarno, F. 2010. *Teknologi Proses Pengolahan Pangan*. Bandung: Alfabeta.
- Mutia, U. 2013. Uji Kadar Asam Laktat pada Keju Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.) Berdasarkan Variasi Waktu dan Konsentrasi Bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus lactis*. Program Studi Kimia FMIPA Universitas Mulawarman.
- Naim, Fatchun. 2014. Isolasi dan Aktivitas Enzim Lipase Hasil Isolasi dari Dedak Padi. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan: Universitas Negeri Semarang.
- Norashirene, M; Umi Sarah, H; Siti Khairiyah, M and Nurdiana, S. 2013. Biochemical Characterization and 16S rDNA Sequencing of Lipolytic Thermophiles from Selayang Hot Spring, Malaysia. *International*

Conference on Agricultural and Natural Resources Engineering. 5: 258 – 264.

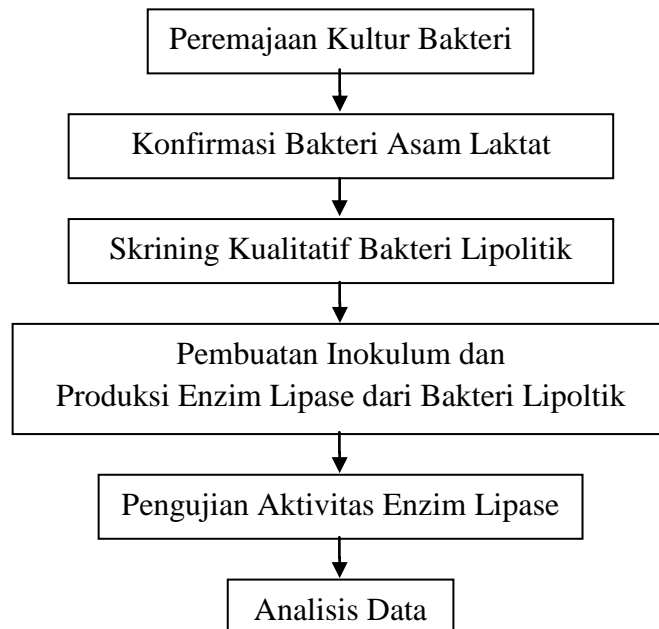
- Nurmarlinda, A: Periadnadi dan Nurmiati. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Bakteri Indigenous Pemfermentasi dari Buah Durian (*Durio zibethinus* Murr.). *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 8-13 (ISSN : 2303-2162).
- Pisol B; Noriham A; Khalillah A and Lilis N. 2015. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Different Stages of Traditional Malaysian Tempeh Production. *Mal. J. Microbiol.* Volume 11(4): 358364.
- Pramiadi, D; Yulianti, E dan Rakhmawat, A. 2014. Isolasi dan uji aktivitas enzim lipase termostabil dari bakteri termofilik pasca erupsi Merapi. *J. Sains Dasar*. Volume 3(1) 9-19.
- Quthb, S. 1992. *Fi Zhilail-Qur'an*. Beirut: Darusyi-Syuruuq.
- Rasyid. 1974. *Bercocok Tanam Kacang Tanah*. Semarang: Lembaga Pusat Penelitian.
- Rizcikal, B. 2017. Isolasi dan Uji Aktivitas Lipolitik Bakteri Asam Laktat (BAL) Asal Bekasam Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*). [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
- Ruiz Ret *et al.* 2019. Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01091>.
- Rustan, I.R. 2013. Studi Isolasi dan Fermentasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Cabai Rawit (*Capsicum frutencens*). [Skripsi]. Makassar: Fakultas Pertanian Universitas Hassanuddin.
- Sarmahet *et al.* 2018. Recent Advances on Sources and Industrial Applications of Lipases. *Biotechnol. Prog.* 34, 5–28.
- Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno and Y.K. Lee. 1999. Probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10 : 107-110.
- Silva, E.O.O *et al.* 2020. Lactic Acid Bacteria with Antimicrobial, Proteolytic and Lipolytic Activities Isolated from Ovine Dairy Products. *Food Science And Technology*. ISSN 1678-457X. <https://doi.org/10.1590/fst.11019>.
- Singh *et al.* 2019. Enzymes as Diagnostic Tools. Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Tecnology. *Elsevier, Netherlands*, pp. 225–271
- Subagiyo, dkk. 2015. Pengaruh Penambahan Berbagai Jenis Sumber Karbon, Nitrogen dan Fosfor pada Medium *de Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Terpilih Yang Diisolasi dari

- Intestinum Udang Penaeid. *Jurnal Kelautan Tropis*. Volume 18, No. 3:127–132. ISSN 0853-7291
- Suciati, P. 2016. Aktivitas Enzimatis Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Kepiting Bacau (*Scylla spp.*) Sebagai Kandidat Probiotik. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. ISSN: 2085-5842. Vol. 8 No. 2.
- Sugiharni, N. 2010. Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas fluorescens* Sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi Antara Asam Lemak Minyak Kelapa dengan Sukrosa. [Skripsi]. Universitas Indonesia.
- Sumarlin, L. O; Mulyadi, D; Suryatna dan Asmara Y. 2013. Identifikasi Potensi Enzim Lipase dan Selulase pada Sampah Kulit Buah Hasil Fermentasi. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI)*. ISSN 0853 – 4217. Vol. 18 (3): 159 166
- Sumual, A; Fatimawali and Tallei, E. 2019. Uji Bakteri Asam Laktat Hasil Fermentasi Selada Romain (*Lactuca sativa var. longifolia Lam.*). Pharmacon – Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Samratulangi. Volume 8 Nomor 2.
- Sun *et al.* 2014. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocin from Newborn Infants Feces. *J Bacteriol Mycol*. Volume 1 No. 2: 7.
- Telussa, I. 2013. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase dari Coco Butter Substitute dan Karakterisasi Lipasenya. *Prosiding FMIPA Universitas Pattimura 2013*; ISBN: 978-602-97522-0-5.
- Umaiya, A.U. 2015. Bakteri Asam Laktat Asal Bekasam Penghasil Lipase pada Substrat Margarin. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor.
- Umsl, 2008. Staining Bacteria. www.umsl.edu/~microbes/pdf/stainingbacteria.pdf. Diakses pada tanggal 11 Desember 2016.
- Underwood AL, Raday JR. 2001. Analisis Kimia Kuantitatif ed. 6 penerjemah: Iis Sopyan, Jakarta (ID): Erlangga. Terjemahan dari Quantitative Analysis: 141.
- Volk, W.A dan Wheeler, M.F. 1998. *Mikrobiologi Dasar*. Terjemahan Markham. Jakarta: Erlangga.
- Yan, J.Y; Yan, Y.J; Madzak, C dan Han, B.N. 2017. Harnessing the Biodiesel Producing Microbes: from Genetic Engineering of Lipase to Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthetic Pathway. *Crit. Rev. Biotechnol*. Volume 37: 26–36.

- Yu J *et al.* 2011. Diversity of Lactic Acid Bacteria Associated with Traditional Fermented Dairy Products in Mongolia. *J. Dairy Sci.* Volume 94: 3229–3241.
- Yusnizar. 2001. Skrining Aktinomisetes dari Ekosistem Air Hitam yang Menghambat Pertumbuhan *Rhizoctonia solani* dan *Helmintosporium orizae* Serta Spektrum Aktivitas Terhadap Mikroba Lain [Thesis]. Bogor: Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Amaliah, Z.Z.N; Saiful B dan Puteri. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Cair Air Rendaman Kacang Kedelai. *JFFI*. Volume 5 No. 1 Halaman: 253-257.
- Zahro F. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Asal Fermentasi Markisa Ungu (*Pasiflora edulis* var.Sims) Sebagai Penghasil Ekspolisakarida. [Skripsi]. Malang: Jurusan Biologi UIN Malang; 2014. Hlm.51-52
- Zheng, Y; Guo, X; Song, N.2010. Thermophilic Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Gene Cloning, Expression and Characterization. *J Molec Catal B: Enzyme*. 69:127-132

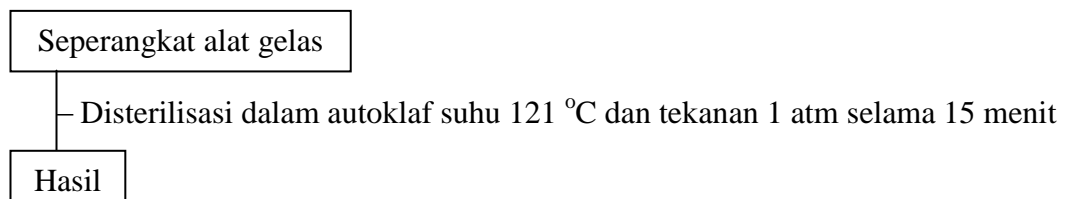
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



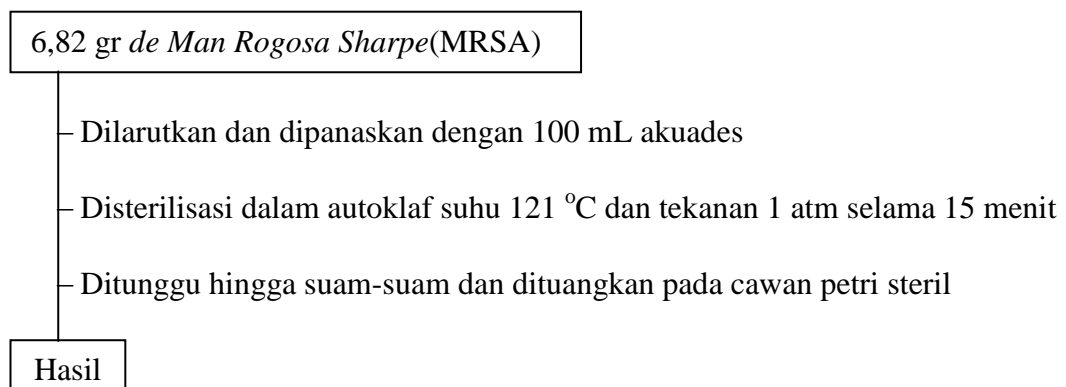
Lampiran 2. Skema Kerja

2.1. Preparasi Alat dan Bahan

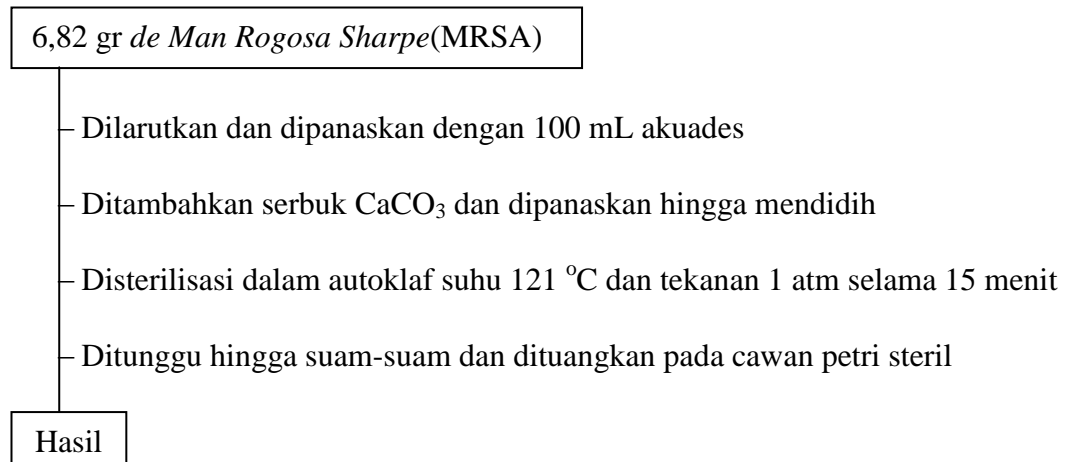


2.2. Pembuatan Media

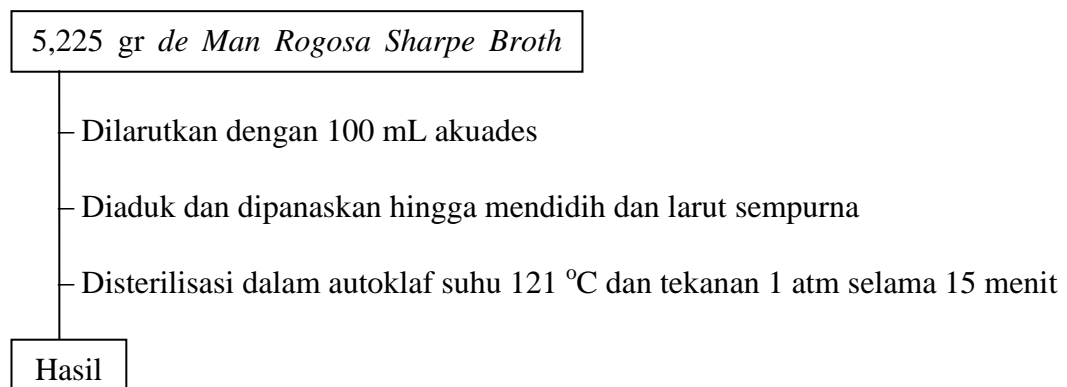
2.2.1 Media *de Man Rogosa Sharpee Agar* (MRSA)



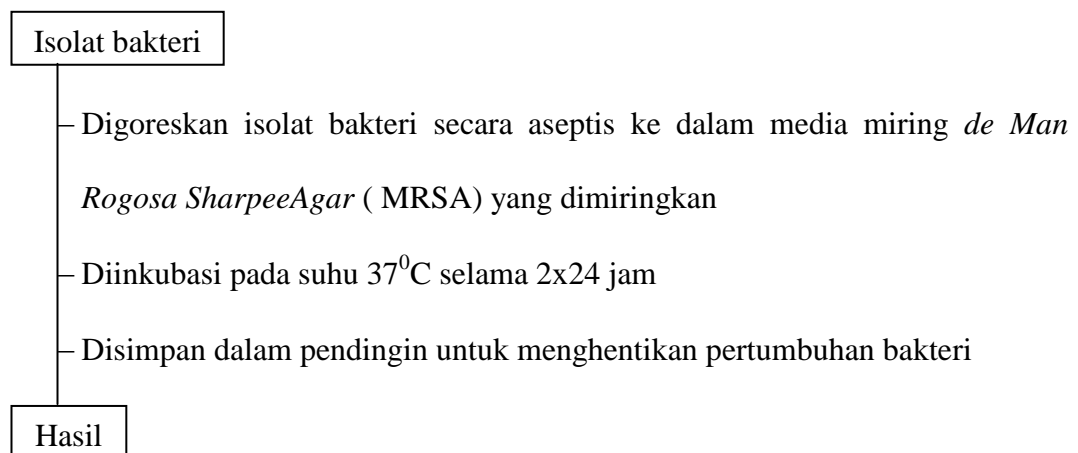
2.2.2 Media *de Man Rogosa Sharpee Agar*-CaCO₃(MRSA-CaCO₃)



2.2.3 Media *de Man Rogosa Sharpee Broth* (MRSB)

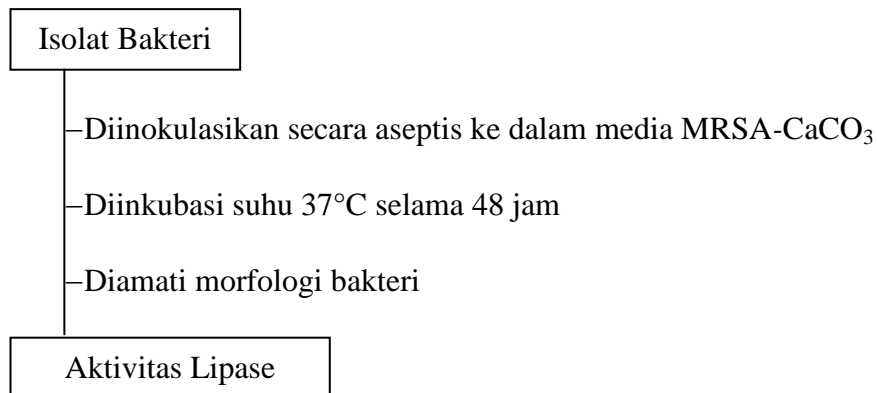


2.3. Peremajaan Kultur Sel

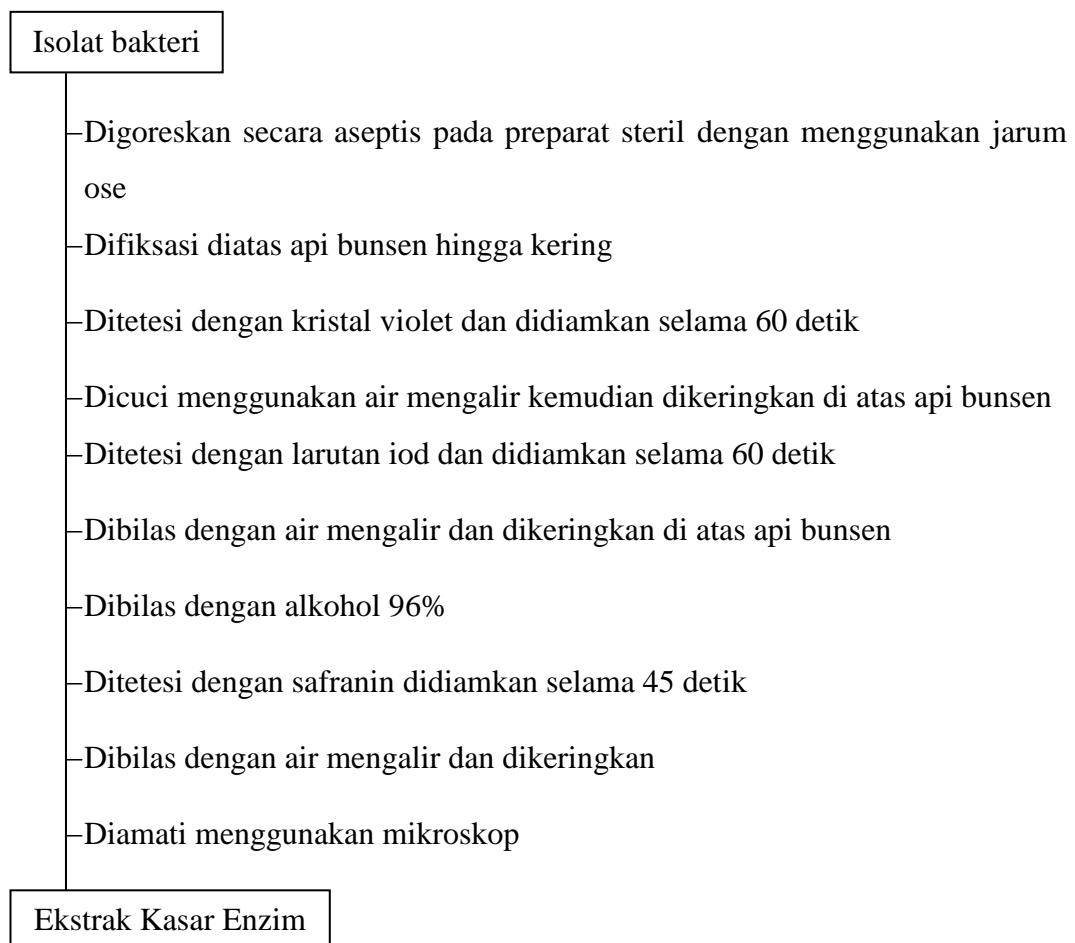


2.4. Konfirmasi Bakteri Asam Laktat

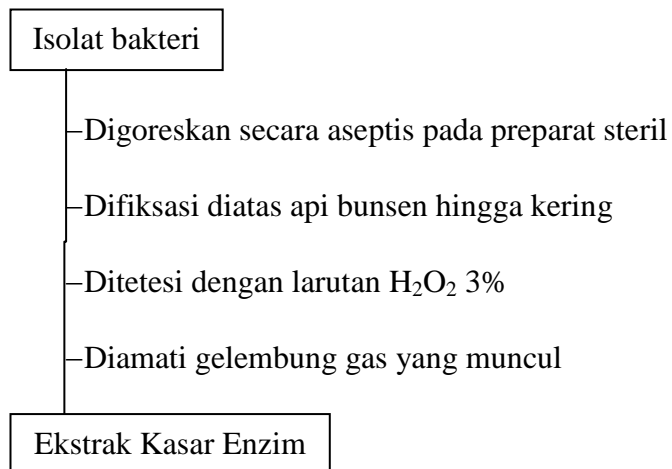
2.4.1 Pembentukan Zona Bening pada Media MRSA-CaCO₃



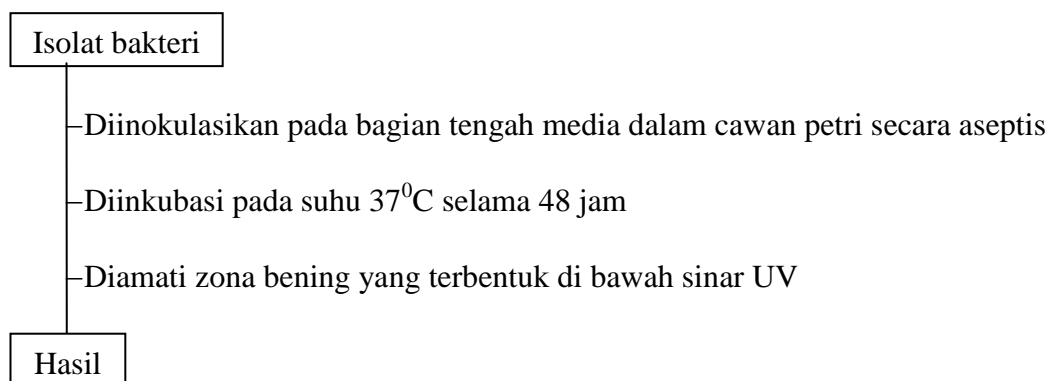
2.4.2 Pewarnaan Gram



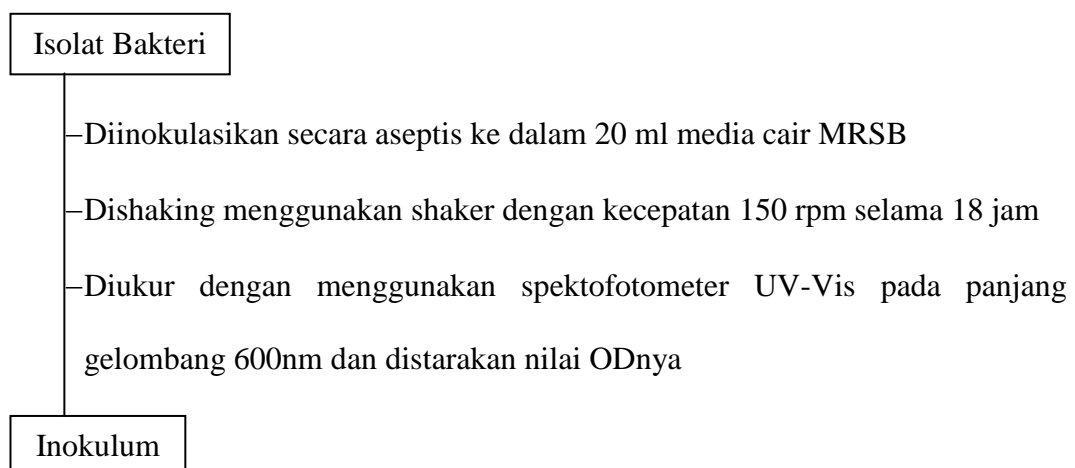
2.4.3 Uji Katalase



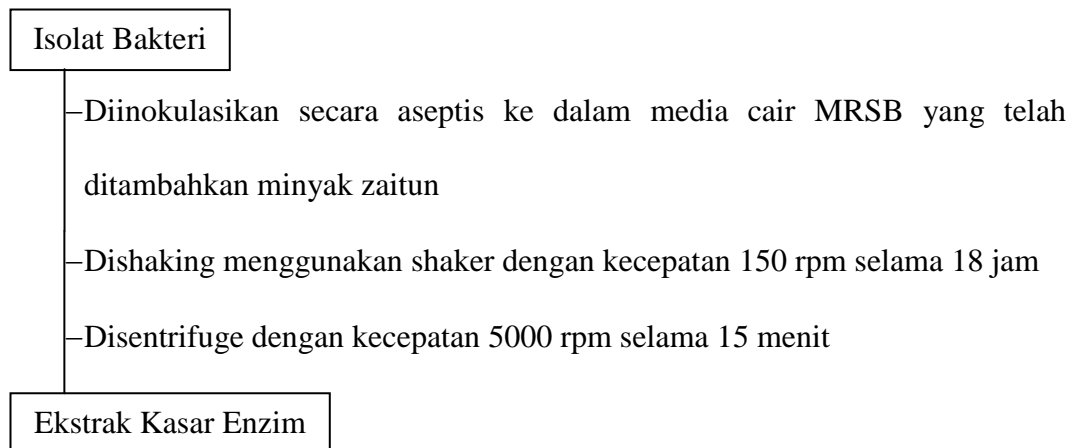
2.5. Skrining Kualitatif Lipolitik



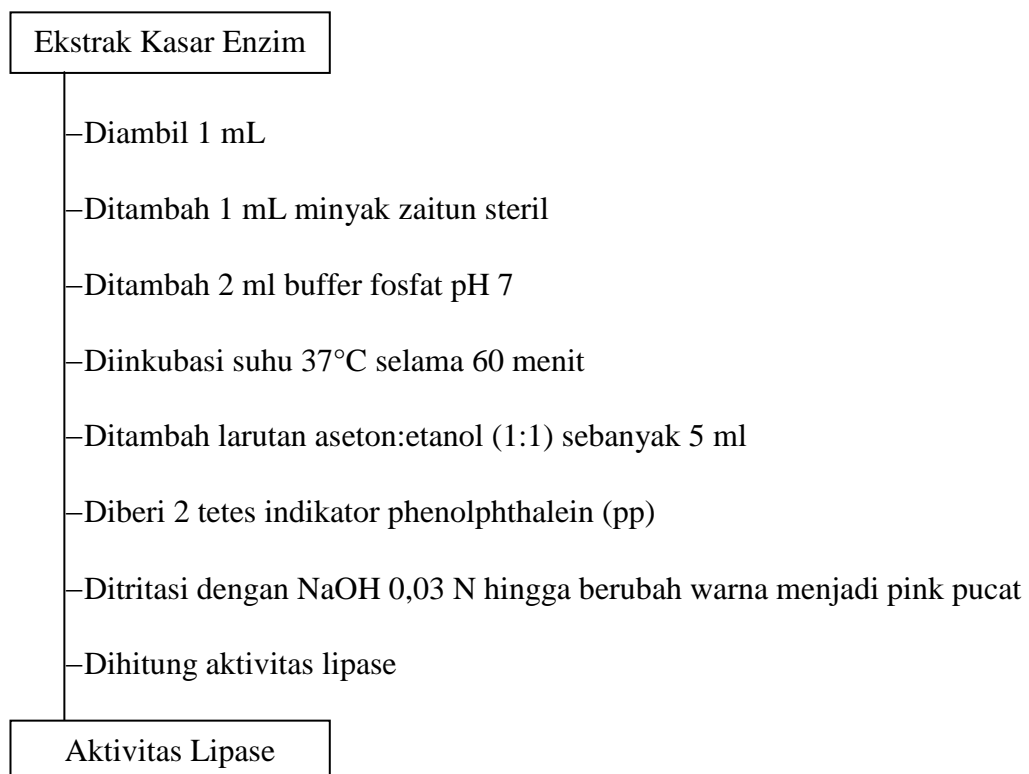
2.6. Pembuatan Inokulum



2.7. Produksi Enzim



2.8. Uji Aktivitas Lipase



Lampiran 3. Pembuatan Media dan Reagen

3.1. Pembuatan Media Selektif *de Man Rogosa Sharpee Agar Rhodamin B* (MRSA Rhodamin B)

Media MRSA Rhodamin B dibuat dengan menimbang sebanyak 6,82 gram MRSA kemudian dilarutkan dan dipanaskan dalam 100 mL akuades. Media yang telah larut ditambahkan dengan Rhodamin B sebanyak 1 gram hingga tercampur rata. Minyak zaitun steril sebanyak 3 mL ditambahkan setelah media MRSA dan Rhodamin B tercampur. Campuran media yang telah larut disetrilkan dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 15 menit. Media dituangkan ke dalam cawan petri steril secara aseptis.

3.2. Pembuatan Larutan Fisiologis 0,85%

Larutan NaCl dibuat dengan menimbang Serbuk NaCl sebanyak 0,85 gr dan dilarutkan dengan 100 mL akuades. Larutan NaCl dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutupi dengan menggunakan kapas dan plastik wrap. Erlenmeyer berisi larutan NaCl disetrilkan dalam autoklaf dengan suhu 121⁰C selama 15 menit.

3.3. Pembuatan Larutan NaOH

Menghitung normalitas NaOH

$$\text{Normalitas} = M \times V$$

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{mol}}{\text{volume (L)}}$$

$$= \frac{\frac{m}{M_r}}{v} \times V$$

Keterangan : M = Molaritas
 v = Valensi
 m = Massa (gram)
 Mr = Massa molekul relatif (g/mol)
 V = Volume pelarut (Liter)

$$\text{Normalitas NaOH} = \frac{\frac{m}{40 \text{ g/mol}}}{\frac{1}{4} \text{ L}} \times \text{valensi NaOH}$$

$$0,03 \text{ N} = \frac{4 \times m}{40 \text{ g/mol}} \times 1$$

$$m = \frac{0,03 \text{ N} \times 40 \text{ g/mol}}{4}$$

$$= 0,3 \text{ gram}$$

Larutan NaOH konsentrasi 0,03 N dibuat dengan menimbang padatan NaOH sebanyak 0,3 gram kemudian dilarutkan dengan akuades hingga larut sempurna. Larutan NaOH kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL, kemudian ditandabatkan dengan akuades dan dihomogenkan.

Lampiran 4. Perhitungan

4.1. Uji Aktivitas Lipase

Data hasil uji aktivitas enzim lipase dapat dilihat pada Tabel L.4.1.1:

Tabel L.4.1.1 Aktivitas enzim lipase dari masing-masing isolat

| Isolat bakteri | Volume larutan NaOH 0,03N (mL) | | Rata-rata volume NaOH () |
|----------------|--------------------------------|------------|--------------------------|
| | Ulangan I | Ulangan II | |
| Blanko | 2,5 | 2,25 | 2,375 |
| B | 9,95 | 11 | 10,475 |
| C | 9,95 | 10,9 | 10,425 |
| D | 9,5 | 10,2 | 9,85 |
| K | 9,8 | 9,6 | 9,7 |
| L | 9,95 | 10,3 | 10,125 |

Keterangan :

- A = Volume (ml) NaOH untuk titrasi sampel
- B = Volume (ml) NaOH untuk titrasi blanko
- 1000 = Konversi mmol ke μmol
- 60 = Waktu inkubasi
- VE = Volume enzim (1 mL)

$$\bullet \text{ Isolat B} = \frac{(10,475 - 2,375) \times 0,03 \times 1000}{1 \times 60}$$

$$= 4,05 \text{ U/mL}$$

$$\bullet \text{ Isolat C} = \frac{(10,425 - 2,375) \times 0,03 \times 1000}{1 \times 60}$$

$$= 4,025 \text{ U/mL}$$

$$\bullet \text{ Isolat D} = \frac{(9,85 - 2,375) \times 0,03 \times 1000}{1 \times 60}$$

$$= 3,738 \text{ U/mL}$$

$$\bullet \text{ Isolat K} = \frac{(9,7 - 2,375) \times 0,03 \times 1000}{1 \times 60}$$

$$= 3,663 \text{ U/mL}$$

$$\bullet \text{ Isolat L} = \frac{(10,125 - 2,375) \times 0,03 \times 1000}{9 \times 6}$$

$$= 3,875 \text{ U/mL}$$

Rata-rata aktivitas enzim lipase yang didapatkan dari masing-masing isolat dapat dilihat pada Tabel L. 4.1.2:

| Tabel L.4.1.2 Rata-rata aktivitas enzim lipase | |
|---|----------------------------------|
| Isolat | Rata-rata Aktivitas Enzim (U/mL) |
| B | 4,05 |
| C | 4,025 |
| D | 3,738 |
| K | 3,663 |
| L | 3,875 |

4.2. Jumlah Total Koloni Bakteri (TPC)

| Tabel L.4.2 Jumlah bakteri | | | | |
|-----------------------------------|---------|---------------|-------------------------|---------------------|
| Perlakuan | Ulangan | Jumlah Koloni | Jumlah Bakteri (CFU/mL) | Rata-rata (CFU/mL) |
| B (10^{-6}) | U1 | 146 | $1,46 \times 10^8$ | $1,54 \times 10^8$ |
| | U2 | 162 | $1,62 \times 10^8$ | |
| B (10^{-7}) | U1 | 95 | $9,5 \times 10^8$ | 9×10^8 |
| | U2 | 85 | $8,5 \times 10^8$ | |
| C (10^{-6}) | U1 | 125 | $1,25 \times 10^8$ | $1,445 \times 10^8$ |
| | U2 | 164 | $1,64 \times 10^8$ | |
| C (10^{-7}) | U1 | 239 | $2,39 \times 10^8$ | $2,915 \times 10^8$ |
| | U2 | 344 | $3,44 \times 10^8$ | |

Perhitungan jumlah bakteri = jumlah koloni x faktor pengenceran (fp)

$$\begin{aligned}
 B (10^{-6}) &= 146 \times 10^6 \text{ CFU/mL} \\
 &= 1,46 \times 10^8 \text{ CFU/mL}
 \end{aligned}$$

Lampiran 5.

Tabel L.5.1 Absorbansi OD inokulum stok

| Isolat | Absorbansi |
|--------|------------|
| B | 2,269 |
| C | 0,822 |
| D | 2,243 |
| K | 2,272 |
| L | 2,258 |

Lampiran 6. Gambar



Isolat B



Isolat C



Isolat D



Isolat K



Isolat L

Gambar L.6.1 Hasil peremajaan kultur bakteri

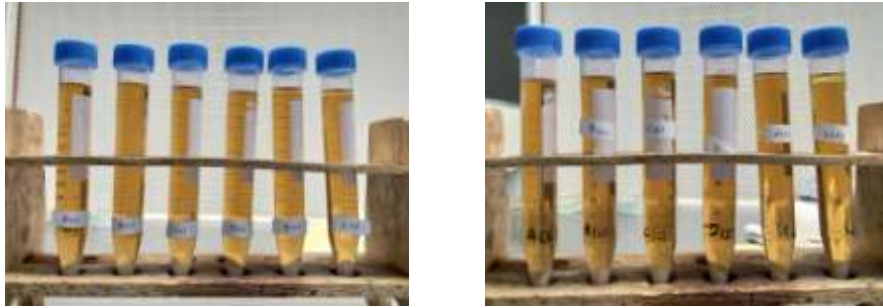


Sebelum inkubasi

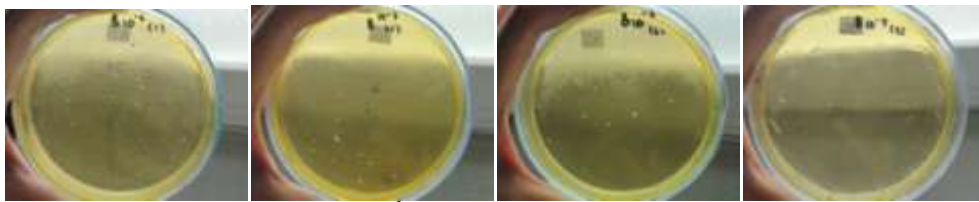


Sesudah inkubasi

Gambar L.6.2 Inokulum bakteri sebelum dan sesudah inkubasi 18 jam

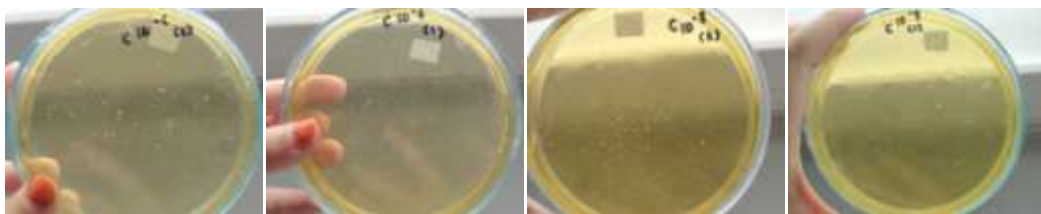


Gambar L.6.3 Hasil sentrifugasi berupa ekstrak kasar enzim



Isolat B pengenceran 10^{-6}

Isolat B pengenceran 10^{-7}



Isolat C pengenceran 10^{-6}

Isolat C pengenceran 10^{-7}

Gambar L.6.4 Jumlah koloni hidup atau *Total Count Plate* (TPC)



Isolat B



Isolat C



Isolat D



Isolat K



Isolat L

Gambar L.6.5 Hasil akhir titrasi pada uji aktivitas enzim lipase